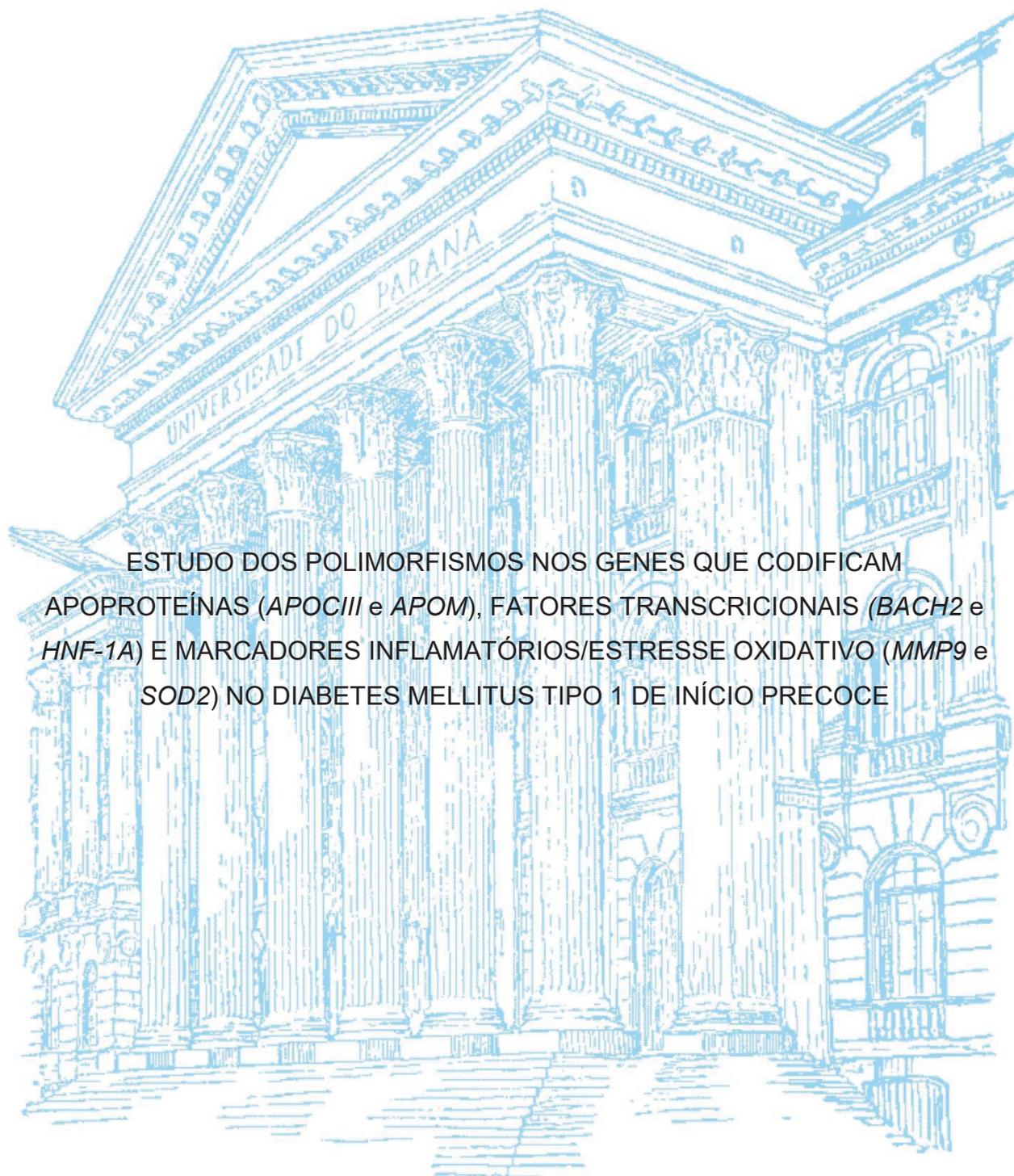


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SUSAN WEBBER DE SOUZA



ESTUDO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES QUE CODIFICAM
APOPROTEÍNAS (*APOCIII* e *APOM*), FATORES TRANSCRICIONAIS (*BACH2* e
HNF-1A) E MARCADORES INFLAMATÓRIOS/ESTRESSE OXIDATIVO (*MMP9* e
SOD2) NO DIABETES MELLITUS TIPO 1 DE INÍCIO PRECOCE

CURITIBA
2021

SUSAN WEBBER DE SOUZA

ESTUDO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES QUE CODIFICAM
APOPROTEÍNAS (*APOCIII* e *APOM*), FATORES TRANSCRICIONAIS (*BACH2* e
HNF-1A) E MARCADORES INFLAMATÓRIOS/ESTRESSE OXIDATIVO (*MMP9* e
SOD2) NO DIABETES MELLITUS TIPO 1 DE INÍCIO PRECOCE

Trabalho apresentado como requisito parcial à
obtenção do grau de doutora em Ciências
Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em
Ciências farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde,
da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiane G. M. Rego
Co-orientadores: Prof. Dr. Geraldo Picheth
Prof^a. Dr^a. Graciele C. M. Manica

CURITIBA

2021

Souza, Susan Webber de

Estudo dos polimorfismos nos genes que codificam apoproteínas, fatores transcricionais (BACH2 e HNF-1a) e marcadores inflamatórios/estresse oxidativo (MMP9 e SOD2) no diabetes *mellitus* tipo 1 de início precoce [recurso eletrônico] / Susan Webber de Souza – Curitiba, 2021.

1 recurso online: PDF.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2021.

Orientador: Profa. Dra. Fabiane G. M. Rego

Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

Coorientador: Profa. Dra. Graciele C. M. Manica

1. Diabetes *mellitus* tipo 1. 2. Complicações diabéticas. 3. Crianças. I. Rego, Fabiane G. M. II. Picheth, Geraldo. III. Manica, Graciele C. M. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 618.924622



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **SUSAN WEBBER DE SOUZA** intitulada: **ESTUDO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES QUE CODIFICAM APOPROTEÍNAS (APOC3 e APOM), FATORES TRANSCRICIONAIS (BACH2 e HNF-1) E MARCADORES INFLAMATÓRIOS/ESTRESSE OXIDATIVO (MMP9 e SOD2) NO DIABETES MELLITUS TIPO 1 DE INÍCIO PRECOCE**, 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, 17 de Dezembro de 2021.

Assinatura Eletrônica
21/12/2021 08:33:45.0
FABIANE GOMES DE MORAES REGO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
23/12/2021 21:06:43.0
CAROLINA WEIGERT GALVAO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica
21/12/2021 18:43:29.0
IZABELLA CASTILHOS RIBEIRO DOS SANTOS WEISS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
23/12/2021 11:45:36.0
MAUREN ISFER ANGHEBEM
Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4098 - E-mail: cfufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 138622

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.pppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 138622

AGRADECIMENTOS

Àquele que foi meu guia e protetor durante toda essa jornada, que mesmo quando me sentia sozinha e sem fé, Ele estava lá.

À minha mãe, meu cerne, minha irmã meu alento e colo, ao Rafael, meu parceiro e porto seguro. Obrigada!!! Vocês foram incríveis ao longo dessa jornada, acreditaram em mim, me apoiaram e não me deixaram desistir. Impossível eu expressar em palavras tamanho amor e gratidão.

À minha vó Jandira que me apresentava e intercedia por mim em cada oração!

Ao meu irmão de outra mãe, Fernando Betim, obrigada por tantas horas de conversa, desabafos, de histórias, de conversa, de choros, mas de muita, muita risada.

As minhas lindas Thanise e Louryana, que trio brasil!!!

À Prof Day por toda amizade, apoio e confiança em mim, sem palavras.

Aos colegas de laboratório, obrigada por todo aprendizado, conversas, almoços do RU, vocês foram incríveis e eu os levarei pra sempre comigo.

À Catiane Pompilio e tia Mana (*In memorian*), sei que iluminaram meus caminhos aí de cima quando me via no escuro.

À minha orientadora Prof Fabi, obrigada por toda dedicação dispensados a mim, jamais esquecerei.

Aos meus co-orientadores obrigada pelo apoio e suporte sem tamanho.

À banca avaliadora meu respeito e gratidão, pois a gratidão é, literalmente, uma das poucas coisas que podem imensuravelmente mudar a vida das pessoas.

*“Se você trabalhar duro e for gentil,
coisas incríveis vão acontecer.”
Conan O’Brien*

RESUMO

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é caracterizado pela destruição auto-imune das células β pancreáticas, induzida por linfócitos T e citocinas inflamatórias, sendo a doença metabólica mais comum entre crianças. A susceptibilidade do indivíduo ao DM1 é determinada por múltiplos genes, sendo considerada uma doença poligênica, tendo como aproximadamente 20% do risco genético associado aos genes da região HLA. O restante do risco genético para o DM1 pode ser atribuído a outros genes, dos quais já foram identificados mais de 60 *loci*, classificados como genes não-HLA. Os fatores genéticos que contribuem para o desenvolvimento das complicações diabéticas crônicas, vem sendo extensivamente estudados, devido sua contribuição para o impacto na qualidade de vida e mortalidade dos indivíduos, com destaque para as doenças cardiovasculares. Desta forma, num estudo do tipo caso-controle, através de PCR em tempo real usando sondas TaqMan®, foram genotipadas 168 crianças saudáveis e 164 crianças com DM1, buscamos associações de variantes genéticas em genes que codificam as apolipoproteínas (*ApoM*, *ApoCIII*), fatores transcricionais (*HNF-1 α* , *BACH2*) e enzimas (*MMP-9*, *SOD2*) com risco para o DM1 bem como as complicações associadas e biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo em indivíduos com DM1. O alelo A do polimorfismo rs2542052 do gene *APOC3*, foi associado ao risco para o desenvolvimento do DM1 na população em estudo. Os demais polimorfismos dos genes *SOD2* (rs4880), *BACH2* (rs3757247), *APOM* (rs805264 e rs707921), *APOC3* (rs5128), *MMP9* (rs17576) e *HNF1A* (rs7310409) não apresentaram diferenças genotípicas e alélicas entre os grupos. Com exceção do rs2542052, os alelos de menor frequência (MAF) dos polimorfismos desse estudo estão de acordo com o encontrado em outras populações caucasianas. As análises de correlação encontradas entre os polimorfismos rs3757247 (*BACH2*), rs805264, rs707921 (*APOM*) e rs7310409 (*HNF1A*) com determinados marcadores bioquímicos (HDL-c, apoM sérica, proteína total e HbA1c) foram estatisticamente fracas, sendo possivelmente ao acaso. Em conclusão, o gene *APOC3* é candidato à associação com DM1, e a presença do alelo A do polimorfismo rs2542052 foi associada ao risco aumentado para o desenvolvimento da doença.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus* tipo 1, genotipagem, complicações diabéticas, *ApoM*, *ApoCIII*, *HNF-1 α* , *BACH2*, *MMP-9*, *SOD2*.

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (DM1) is characterized by autoimmune destruction of pancreatic β cells, induced by T lymphocytes and inflammatory cytokines, and is the most common metabolic disease among children. The individual's susceptibility to DM1 is determined by multiple genes, being considered a polygenic disease, with approximately 20% of the genetic risk associated with genes in the HLA region. The remainder of the genetic risk for DM1 can be attributed to other genes, which more than 60 loci have been identified, classified as non-HLA genes. The genetic factors that contribute to the development of chronic diabetic complications have been extensively studied, due to their contribution to the impact on the quality of life and mortality of individuals, with emphasis on cardiovascular diseases. Thus, in a case-control study, using real-time PCR using TaqMan® probes, 168 healthy children and 164 children with DM1 were genotyped, we searched for associations of genetic variants in genes encoding apolipoproteins (ApoM, ApoCIII), transcriptional factors (HNF-1 α , BACH2) and enzymes (MMP-9, SOD2) with risk for DM1 as well as the associated complications and biomarkers of inflammation and oxidative stress in individuals with DM1. The A allele of the rs2542052 polymorphism of the APOC3 gene was associated with the risk of developing DM1 in the study population. The other polymorphisms of the SOD2 (rs4880), BACH2 (rs3757247), APOM (rs805264 and rs707921), APOC3 (rs5128), MMP9 (rs17576) and HNF1A (rs7310409) genes did not show genotypic and allelic differences between groups. With the exception of rs2542052, the lowest frequency alleles (MAF) of the polymorphisms in this study are in agreement with those found in other Caucasian populations. The correlation analyzes found between the polymorphisms rs3757247 (BACH2), rs805264, rs707921 (APOM) and rs7310409 (HNF1A) with certain biochemical markers (HDL-c, serum apoM, total protein and HbA1c) were weak, possibly being statistically random. In conclusion, the APOC3 gene is a candidate for association with DM1, and the presence of the A allele of the rs2542052 polymorphism was associated with an increased risk for the development of disease.

Keywords: Type 1 diabetes mellitus, genotyping, diabetic complications, ApoM, ApoCIII, HNF-1 α , BACH2, MMP-9, SOD2.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ENVOLVIMENTO DOS GENES DE ESTUDO COM DM1.	17
FIGURA 2. ESTIMATIVAS E PROJEÇÕES DA PREVALÊNCIA GLOBAL DE DM COM IDADE DE 20 A 79 ANOS.	21
FIGURA 3. INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA DE DM1 EM CRIANÇAS.	22
FIGURA 4. ESTÁGIOS DO DM1.	24
FIGURA 5. PATOGÊNESE DO DM1.	25
FIGURA 6 UMA VISÃO ATUALIZADA DO DIÁLOGO ENTRE AS CÉLULAS B E O SISTEMA IMUNOLÓGICO.	27
FIGURA 7. PATOGÊNESE DAS COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS: O PAPEL DA HIPERGLICEMIA COMO O CAUSA DA INFLAMAÇÃO E DO ESTRESSE OXIDATIVO.	30
FIGURA 8 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E EFEITO DO POLIMORFISMO RS4880 DO GENE SOD2	35
FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS REGIÕES REGULATÓRIAS QUE ORIENTAM A EXPRESSÃO DO GENE SOD2.	37
FIGURA 10: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE BACH2.	40
FIGURA 11. EFEITO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO BACH2 NA RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA 43	43
FIGURA 12. LOCALIZAÇÃO DO GENE BACH2 NO CROMOSSOMO.	45
FIGURA 13. LOCALIZAÇÃO E INTERAÇÕES ENTRE INIBIDORES DE TECIDO DE METALOPROTEASES DE MATRIZ (TIMPS) E METALOPROTEASES DE MATRIZ (MMPs) ...	48
FIGURA 14. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS DOENÇAS ASSOCIADAS A MMP-9.....	49
FIGURA 15 ESQUEMA REPRESENTATIVO DO CROMOSSOMO HUMANO 20 E A LOCALIZAÇÃO DO GENE MMP9 E O POLIMORFISMO RS17576.	52
FIGURA 16. VISÃO GERAL ESQUEMÁTICA DO METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS E METABOLISMO REVERSO DO COLESTEROL.	66
FIGURA 17 METABOLISMO DA APOC3 E DAS LIPOPROTEÍNAS RICAS EM TRIGLICERÍDEOS (TRL).....	68
FIGURA 18. APOC3 E ATEROSCLEROSE.	71
FIGURA 19. MECANISMOS MOLECULARES NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA APOC3.	73
FIGURA 20. MODELO PROPOSTO PARA O PAPEL DE POLIMORFISMOS NO GENE APOC3 NA ETIOLOGIA DO DM1 75	75
FIGURA 21. LOCALIZAÇÃO CROMOSSOMAL DO GENE APOC3 E DOS POLIMORFISMOS RS2542052 E RS5128.	76
FIGURA 22 O IMPACTO DA APOM EM SER UMA APOLIPOPROTEÍNA TROCÁVEL ENTRE AS LIPOPROTEÍNAS.	79
FIGURA 23. BIOGÊNESE DE S1P E PAPEL POTENCIAL DE APOM E S1P EM DIABETES, OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA 83	83
FIGURA 24. VIAS DE SINALIZAÇÃO S1P E RECEPTORES S1P NA INFLAMAÇÃO E PROCESSOS IMUNOLÓGICOS 91	91
FIGURA 25 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO HEPÁTICA DE APOM.	98
FIGURA 26. LOCALIZAÇÃO DO GENE APOM NO CROMOSSOMO 6 E AS POSIÇÕES CORRESPONDENTES DOS POLIMORFISMOS Rs805297, Rs9404941, Rs805296, Rs805264, E Rs707921 NOS DIFERENTES TRANSCRITOS DO GENE APOM.	100
FIGURA 27. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE HNF1A 104	104
FIGURA 28. MODELO PROPOSTO DE ALTERAÇÕES DE HNF1A E DISFUNÇÕES EM CÉLULAS B HUMANAS.	105
FIGURA 29 - PRINCÍPIO DA PCR EM TEMPO REAL COM SONDAS FLUORESCENTES TAQMAN®.	112
FIGURA 30 – FLUXOGRAMA DE TRABALHO.	115
FIGURA 30. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO Rs3757247 DO GENE BACH2 COM AS CONCENTRAÇÕES DE HDL PARA O GRUPO DM1.	146
FIGURA 31. ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS Rs707921 E Rs805264 DO GENE APOM COM AS CONCENTRAÇÕES DE HDL PARA O GRUPO DM1.	147
FIGURA 32. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO Rs805264 DO GENE APOM COM AS CONCENTRAÇÕES DE APOM PLASMÁTICA PARA O GRUPO DM1 148	148
FIGURA 33. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO Rs7310409 DO GENE HNF1A COM AS CONCENTRAÇÕES DE HbA1c PARA O GRUPO CONTROLE.	150

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DAS PRINCIPAIS APOLIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....	55
TABELA 2. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO E FUNÇÃO DE <i>APOM</i>	96
TABELA 3. PROCESSOS BIOLÓGICOS DE <i>HNF1A</i> EM CERTOS TECIDOS HUMANOS.....	102
TABELA 4 - CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO.....	111
TABELA 5 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS.....	113
TABELA 6. CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E CLÍNICA DOS GRUPOS DM1 E CRIANÇAS-CONTROLE UTILIZADAS NO ESTUDO.....	116
TABELA 7. DADOS LABORATORIAIS E ANTROPOMÉTRICOS DOS GRUPOS EM ESTUDO.....	118
TABELA 8. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO <i>rs4880</i> NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	124
TABELA 9. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO <i>rs4880</i> DO GENE <i>SOD2</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	126
TABELA 10. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO <i>rs3757247</i> NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	127
TABELA 11. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO <i>rs3757247</i> DO GENE <i>BACH2</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	128
TABELA 12. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO <i>rs17576</i> NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	130
TABELA 13. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO <i>rs17576</i> DO GENE <i>MMP9</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	131
TABELA 14. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS <i>rs5128</i> E <i>rs2542052</i> NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	133
TABELA 15. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO <i>rs5128</i> DO GENE <i>APOC3</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	133
TABELA 16. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO <i>rs2542052</i> DO GENE <i>APOC3</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	135
TABELA 17. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	138
TABELA 18. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO <i>rs805264</i> DO GENE <i>APOM</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	139
TABELA 19. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO <i>rs707921</i> DO GENE <i>APOM</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	140
TABELA 20. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	142
TABELA 21. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO <i>rs7310409</i> DO GENE <i>HNF1A</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	142
TABELA 22. CORRELAÇÕES SIGNIFICATIVAS ($P < 0.005$) ENTRE ALGUNS POLIMORFISMOS E PARÂMETROS LABORATORIAIS NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	144

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1,5 AG	1,5 Anidroglicitol
ADA	<i>American Diabetes Association</i> ; Associação Americana de Diabetes
apoM	apolipoproteína M
AVC	Acidente vascular cerebral
BTB	<i>Broad complex, Tram track, Bric-a-brac</i> ; Bricabraque, Tramtrack, Broad-complexo
CAD	Cetoacidose diabética
CNC	<i>Cap'n'collar</i>
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMG	Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Ácido desoxirribonucleico
FPIR	<i>First phase insulin response</i> ; Primeira Fase de Resposta à Insulina
GAD	<i>Glutamic Acid Decarboxylase</i> ; Anti-descarboxilase do ácido glutâmico
GADA	<i>Autoantibodies to GAD</i> ; Autoanticorpos para GAD
GAD65	<i>Isoform of Glutamate Decarboxylase</i> ; Isoforma do ácido glutâmico
HbA1c	Hemoglobina glicada fração A1C
HDL-C	<i>High density lipoprotein – cholesterol</i> ; HDL- colesterol
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> ; Antígeno leucocitário humano
H-W	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IAA	<i>Insulin autoantibodies</i> ; Autoanticorpos anti-insulina
IA-2	<i>Islet Antigen 2</i> ; Autoanticorpos anti-ilhotas
IC 95%	Índice de confiança de 95%
ICA	<i>Islet Cell Antibodies</i> ; Autoanticorpos citoplasmáticos anti-ilhotas
IMC	Índice de massa corpórea
ISPAD	<i>International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes</i> ; Sociedade internacional para crianças e adolescentes com diabetes
IVGTT –	<i>Intravenous Glucose Tolerance Test</i> ; Teste intravenoso de tolerância à glicose

LDL-C	<i>Low Density Lipoprotein – cholesterol</i> ; LDL-Colesterol
MODY	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i> ; Diabetes da maturidade de início precoce
P	Probabilidade
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Reação em cadeia da polimerase
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ; Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> ; Polimorfismos de único nucleotídeo
VLDL	<i>Very low density lipoprotein – cholesterol</i> ; Lipoproteína de densidade muito baixa
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Organização mundial da saúde
ZnT8	<i>Zinc Transporter-8</i> ; Transportador de Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo geral	17
1.1.2	Objetivos específicos.....	17
2	REVISÃO DE literatura	18
2.1	DIABETES MELLITUS	18
2.1.1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	22
2.2	Complicações associadas ao DM1.....	28
2.3	Genes candidatos para DM1	32
2.3.1	Gene Superoxide dismutase 2, mitochondrial	33
2.3.2	Gene broad complex-tramtrack-bric a brac and Cap'n'collar homology 2 (BACH2) 39	
2.3.3	Matrix Metalloproteinase 9	46
2.3.4	Apolipoproteínas.....	53
2.3.4.1	Gene Apolipoproteína C3	68
2.3.4.2	Gene Apolipoproteína M.....	77
2.3.5	Gene Hepatocyte nuclear factor 1-alpha	101
3	MATERIAL E MÉTODOS	108
3.1	AMOSTRAS	108
3.1.1	Crítérios para a caracterização da amostra.....	109
3.2	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO	110
3.3	DOSAGENS BIOQUÍMICAS	110
3.4	GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS.....	111
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	113
3.6	FLUXOGRAMA DE TRABALHO	115
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	115
4.2	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	118
4.3	ANÁLISES MOLECULARES.....	124
4.3.1	GENE SUPERÓXIDO DISMUTASE 2.....	124
4.3.2	GENE BASIC LEUCINE ZÍPER TRANSCRIPTION FACTOR 2.....	127
4.3.3	GENE METALOPROTEINASE DE MATRIX 9	130
4.3.4	GENE APOLIPOPROTEÍNA C3.....	132
4.3.5	GENE APOLIPOPROTEÍNA M	137
4.3.6	GENE FATOR NUCLEAR DOS HEPATÓCITOS 1 α	141
4.4	ANÁLISES de correlação	144

5	CONCLUSÕES	150
	REFERÊNCIAS.....	152

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é caracterizado pela destruição auto-imune das células β pancreáticas, induzida por linfócitos T e citocinas inflamatórias (EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009; TODD, 2010; ZIEGLER; NEPOM, 2010). O DM1 é a doença endócrina e condição metabólica mais comum que ocorre em crianças (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014). Hiperglicemia de longa data (MATTILA; DE BOER, 2010; MELENDEZ-RAMIREZ; RICHARDS; CEFALU, 2010; MCCRIMMON; RYAN; FRIER, 2012) e o baixo grau inflamação (SCHRAM *et al.*, 2005) são mecanismos subjacentes ao curso do DM1 desempenha um papel crítico no desenvolvimento de complicações diabéticas micro e macrovasculares. Em vista do atual aumento na prevalência do diabetes tipo 1 em crianças e adolescentes (PATTERSON *et al.*, 2019; MOBASSERI *et al.*, 2020), a identificação de biomarcadores preditivos e o rastreamento regular são muito importantes.

A susceptibilidade do indivíduo ao DM1 é determinada por múltiplos genes, sendo considerada uma doença poligênica. No entanto, sabe-se que genótipos do gene HLA (*Human Leukocyte Antigen*) conferem de 20 a 50% risco para o desenvolvimento da doença (REDONDO; FAIN; EISENBARTH, 2001; STECK; REWERS, 2011; INSEL, R. A. *et al.*, 2015). O restante do risco genético para o DM1 pode ser atribuído a outros genes, dos quais já foram identificados mais de 60 *loci*, classificados como genes não-HLA (BARRETT *et al.*, 2009; SEPE; LOVISELLI; BOTTAZZO, 2009). Além disso, tecnologias genéticas avançadas, tem se tornado estratégia importante para a identificação de fatores genéticos que contribuem para o desenvolvimento das complicações diabéticas crônicas (HUANG, Y. C. *et al.*, 2011; SANDHOLM *et al.*, 2012{Huang, 2011 #9151}).

A doença cardiovascular (DCV) é altamente prevalente em pacientes com DM1 e uma das principais causas de mortalidade (JORGENSEN; ALMDAL; CARSTENSEN, 2013; LIVINGSTONE *et al.*, 2015; RAWSHANI *et al.*, 2018). DCV surge mais cedo na vida em pacientes DM1 e é responsável por uma redução significativa de expectativa de vida de pelo menos 11 anos (LIVINGSTONE *et al.*, 2015). Além disso, a incidência de DCV é muito mais pronunciada em pacientes com DM1 com início em uma idade mais precoce

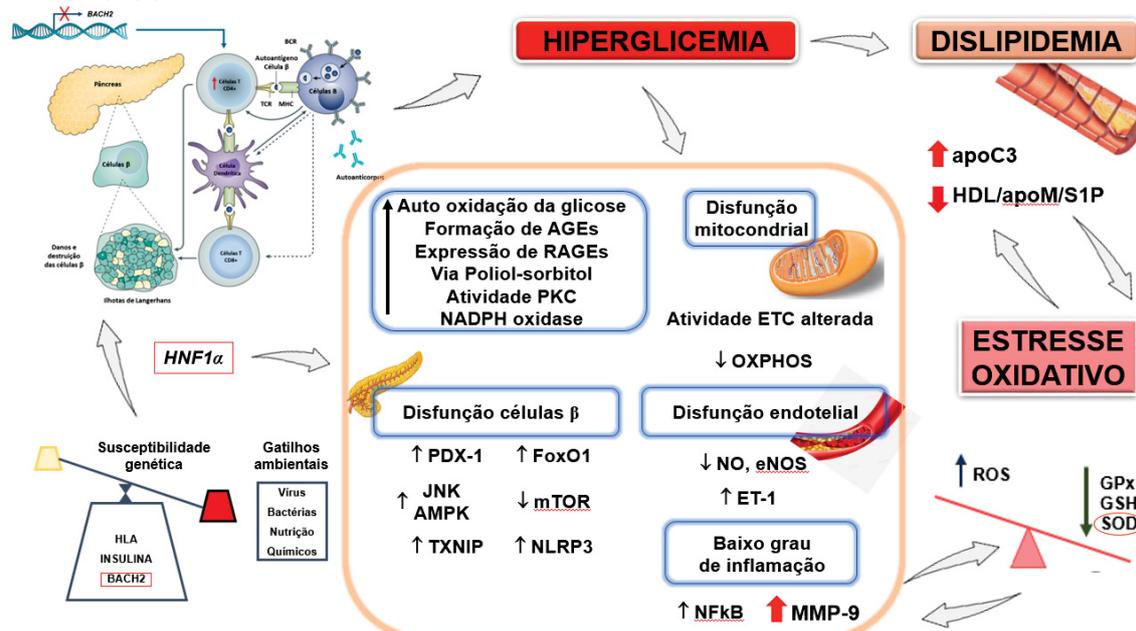
(RAWSHANI *et al.*, 2018). No entanto, os fatores responsáveis pelo aumento da aterosclerose e DCV em DM1 ainda não são totalmente esclarecidos. Além dos fatores de risco cardiovasculares (CV) usuais, a hiperglicemia crônica desempenha um papel importante ao promover o estresse oxidativo, inflamação vascular, adesão de monócitos, espessamento da parede arterial e disfunção endotelial. E na verdade, o risco de DCV permanece significativamente aumentado mesmo em pacientes DM1 bem controlados que não têm fatores de risco CV adicionais, indicando que outros fatores potenciais podem estar envolvidos. A hipoglicemia e a variabilidade da glicose podem aumentar a CV doença, promovendo estresse oxidativo, inflamação vascular e disfunção endotelial (VERGES, 2020a).

Além do mais, mesmo os pacientes DM1 bem controlados mostram anormalidades qualitativas e funcionais significativas das lipoproteínas que provavelmente estão implicadas no desenvolvimento de aterosclerose e DCV prematura (VERGES, 2020b). Dados recentes também sugerem que um sistema imunológico disfuncional, que é típico de DM1 autoimune, também pode promover DCV, possivelmente por meio de vias inflamatórias (GOTTUMUKKALA *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2019). E, com sobrepeso e obesidade pacientes com DM1 podem manifestar risco CV adicional por meio de mecanismos fisiopatológicos semelhantes aos observada em diabetes tipo 2 (DM2) (REAVEN, 2002).

Estudos identificaram variantes genéticas como reguladores das concentrações plasmáticas de lipídios e subsequente dislipidemia (NIU *et al.*, 2007), da resposta inflamatória (WATSON *et al.*, 2021) e do estresse oxidativo (WANG, L. I. *et al.*, 2001; SUTTON *et al.*, 2003).

Desta forma, o objeto deste estudo foi avaliar associação de variantes genéticas em genes que codificam as apolipoproteínas (ApoM, ApoCIII), fatores transcricionais (HNF-1 α , BACH2) e enzimas (MMP-9, SOD2) com risco para o DM1 bem como as complicações associadas e biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo em indivíduos com DM1.

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ENVOLVIMENTO DOS GENES DE ESTUDO COM DM1.



FONTE: O autor, 2021.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar variações genéticas nos genes *SOD2*, *BACH2*, *APOM*, *APOC3*, *MMP9* e *HNF1A* em portadores de Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) de início na infância.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos nos genes *SOD2* (rs4880), *BACH2* (rs3757247), *APOM* (rs805264 e rs707921), *APOC3* (rs5128 e rs2542052), *MMP9* (rs17576) e *HNF1A* (rs7310409) em crianças com DM1 e saudáveis;
- Quantificar as concentrações plasmáticas de apoM através do ensaio de ELISA em crianças com DM1 e saudáveis;
- Avaliar associação entre as variantes genéticas e risco/proteção para o DM1;

- Avaliar associação entre as variantes genéticas e os marcadores laboratoriais do perfil lipídico, controle glicêmico, e biomarcadores de processo inflamatório e estresse oxidativo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS

O Diabetes *mellitus* (DM) apresenta-se como um distúrbio metabólico complexo caracterizado por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção de insulina, ação dela ou ambos (ADA, 2014; MAYER-DAVIS *et al.*, 2018; SBD, 2019).

A Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association* – ADA) (ADA, 2021) e a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (SBD, 2019) classificam o Diabetes *mellitus* em quatro categorias gerais de acordo com sua etiologia:

- Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) que ocorre devido à autodestruição das células β pancreáticas o que leva a deficiência na produção de insulina;
- Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) sendo consequência à perda progressiva da secreção de insulina com frequência resistência à sua ação;
- Diabetes *mellitus* gestacional (DMG) diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gestação que não era claramente manifesto antes dessa condição;
- Tipos específicos de diabetes devido outras causas, como síndromes monogênicas do diabetes: diabetes neonatal e diabetes de maturidade em jovens (*MODY*), doenças do pâncreas exócrino (como fibrose cística e pancreatite) e diabetes induzido por drogas ou produtos químicos (como o uso de glicocorticoide no tratamento do HIV/AIDS ou após transplante de órgãos).

O diagnóstico do DM é baseado nas alterações das concentrações plasmáticas de glicose em diferentes situações – jejum, ao acaso, após

sobrecarga – e na aferição da hemoglobina glicada (Quadro 1) (GROSS *et al.*, 2002; SBD, 2018a).

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

Glicemia ao acaso ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L). Deve ser realizada em pacientes com sintomas clássicos ou em crise hiperglicêmica;

Ou

Glicemia 2 horas após sobrecarga de 75 g de glicose por via oral ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L). O paciente não deve fazer alterações alimentares no período que precede o exame;*

Ou

Glicemia em jejum ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L). O jejum deve ocorrer num período mínimo de pelo menos 8 horas;*

Ou

HbA1c $\geq 6,5\%$ (48mmol/mol). O teste deve ser realizado pelo método padronizado e certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) e nos padrões da *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT).*

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

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

Uma mudança conceitual emergente no campo do diabetes é reconhecer a heterogeneidade no DM1 e DM2 em adultos, mas considerar essas novas formas de diabetes como uma sobreposição entre DM1 e DM2 em vez de síndromes distintas com diferentes etiologias (BALASUBRAMANYAM, 2021). Assim, os biomarcadores utilizados correntemente para o diagnóstico do DM possuem limitações. Além disso, estes biomarcadores clássicos são úteis apenas após o estabelecimento da doença e falham na predição da doença na condição pré-diabética. Prognóstico da doença nos estágios iniciais e predição populacional de maior risco requerem a identificação de marcadores específicos que sejam sensíveis o suficiente para detectar os estágios iniciais da doença. Biomarcadores que pudessem prever o risco da doença seriam úteis para o desenvolvimento de terapias preventivas e proativas para indivíduos que se encontram em alto risco de desenvolvimento do DM (VAISHYA; SARWADE; SESHADRI, 2018).

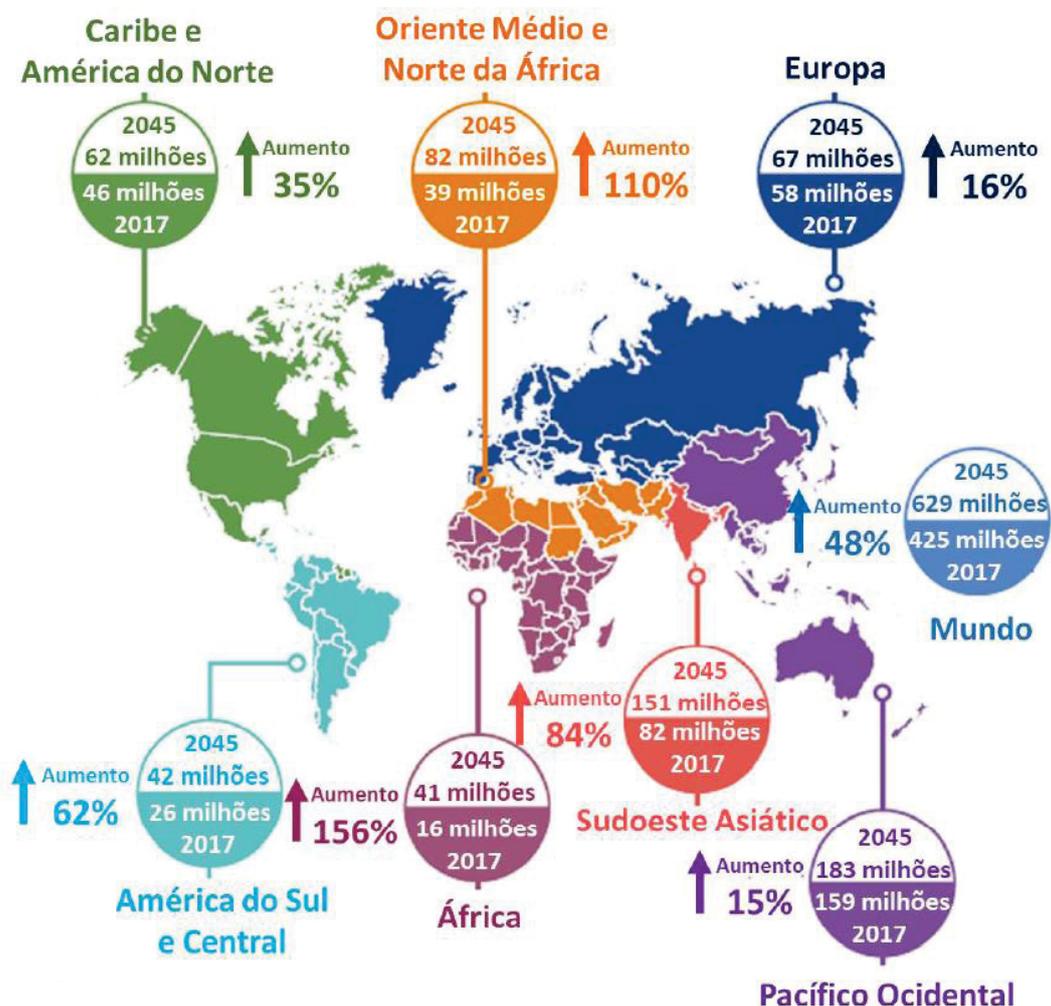
O DM é um problema crescente de saúde em todo o mundo (SBD, 2018b). Em 2000, segundo o IDF (2019) a estimativa global de adultos vivendo com diabetes era de 151 milhões e em 2009 esse número havia crescido 88%, saltando para 285 milhões. Atualmente pressupõe-se que 463 milhões de adultos entre 20 e 79 anos tenham DM2 e 1,1 milhão de indivíduos com menos

de 20 anos tenham DM1 (IDF, 2019). Em 2010, a projeção global para 2025 era de 438 milhões, mas em 2020, essa previsão já foi superada em 25 milhões, mostrando o aumento desacelerado da doença; para 2045 o número estimado de indivíduos com DM é de 700 milhões, conforme ilustra FIGURA 2

No Brasil, as cidades de Ribeirão Preto, São Carlos e Porto Alegre mostraram para o DM taxas de prevalência de 12,1%, 13,5% e 12,4%, respectivamente (TORQUATO *et al.*, 2003; SCHAAN; HARZHEIM; GUS, 2004; BOSI *et al.*, 2009). Em relação ao DM1, estudos mostraram sua incidência na cidade de Bauru, na região sudeste, 10,4 por 100.000 pessoas/ano; Londrina com 12,7 por 100.000 pessoas/ano e Passo Fundo com 12 por 100.000 pessoas/ano, na região sul (CAMPOS *et al.*, 1998; LISBOA *et al.*, 1998; NEGRATO *et al.*, 2010) .

Segundo Henriques e colaboradores (2018), o DM é considerado a quinta principal causa de internação em hospitais, pois aumenta o risco de comprometimento do sistema neurológico, vascular periférico, cardiovascular, renal, oftalmológico, endócrino e metabólico, além de outras complicações (ADA, 2018); além de ser considerada a décima principal causa de óbito (HENRIQUES *et al.*, 2018). Desse modo, o diabetes aumenta o custo do tratamento dos indivíduos (ADA, 2018), sendo considerada uma doença de alto custo.

FIGURA 2. ESTIMATIVAS E PROJEÇÕES DA PREVALÊNCIA GLOBAL DE DM COM IDADE DE 20 A 79 ANOS.



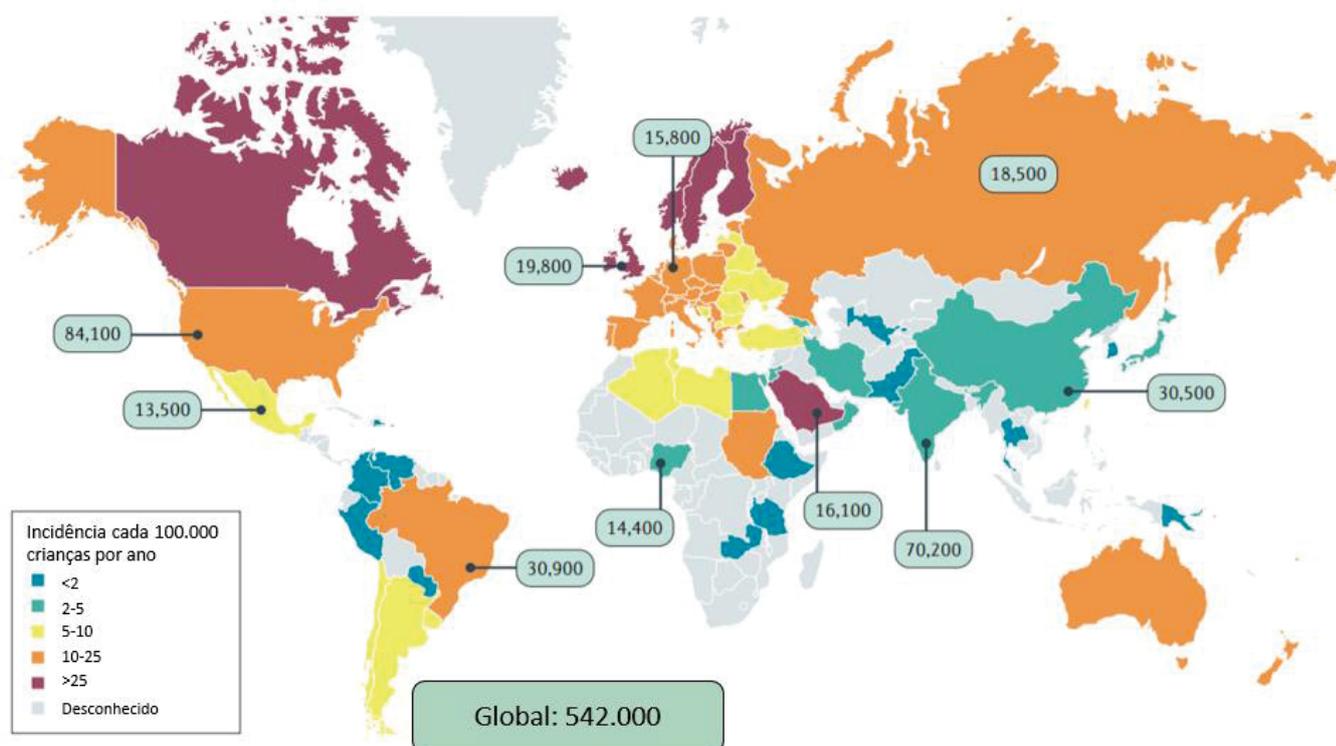
FONTE: ADAPTADO DE IDF, 2019.

O DM1 é a forma mais comum de diabetes em crianças com menos de 15 anos de idade; os dados mostram que em 2017 mais de 500.000 crianças tinham diabetes tipo 1, sendo uma doença com aumento da incidência em todo o mundo (KATSAROU *et al.*, 2017). Estima-se que aproximadamente 90.000 crianças sejam diagnosticadas a cada ano e a taxa de incidência varia acentuadamente entre os países (DIAZ-VALENCIA; BOUGNERES; VALLERON, 2015), conforme figura 3.

Segundo o estudo retrospectivo de 2008 a 2010, no Brasil o DM1 teve um custo médico total de US\$ 1319,15 *per capita*; os gastos relacionados ao tratamento são de US\$ 1216,33 por paciente/ano, representando 92,2% do custo médico direto total (COBAS *et al.*, 2013), evidenciando o alto custo da doença e

demonstrando o importante impacto econômico do DM1 sobre o sistema de saúde no Brasil.

FIGURA 3. INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA DE DM1 EM CRIANÇAS.



O número estimado de novos casos de DM1 em crianças <15 anos de idade por 100.000 indivíduos em 2015. A prevalência de DM1 nos 10 países mais afetados. Fonte: Adaptado de Katsarou *et al.*, 2017.

É importante ressaltar que os custos do DM1 aumentaram proporcionalmente à duração da doença e esse aumento pode ter um impacto nos gastos com saúde, pois complicações crônicas se tornam mais prevalentes à medida que progride a doença, desse modo é necessário incentivar uma reavaliação da distribuição de recursos para gerenciar o DM1 e desencadear estudos de custo-efetividade para otimizar o tratamento a longo prazo do DM1 no Brasil (COBAS *et al.*, 2013).

2.1.1 Diabetes *mellitus* tipo 1

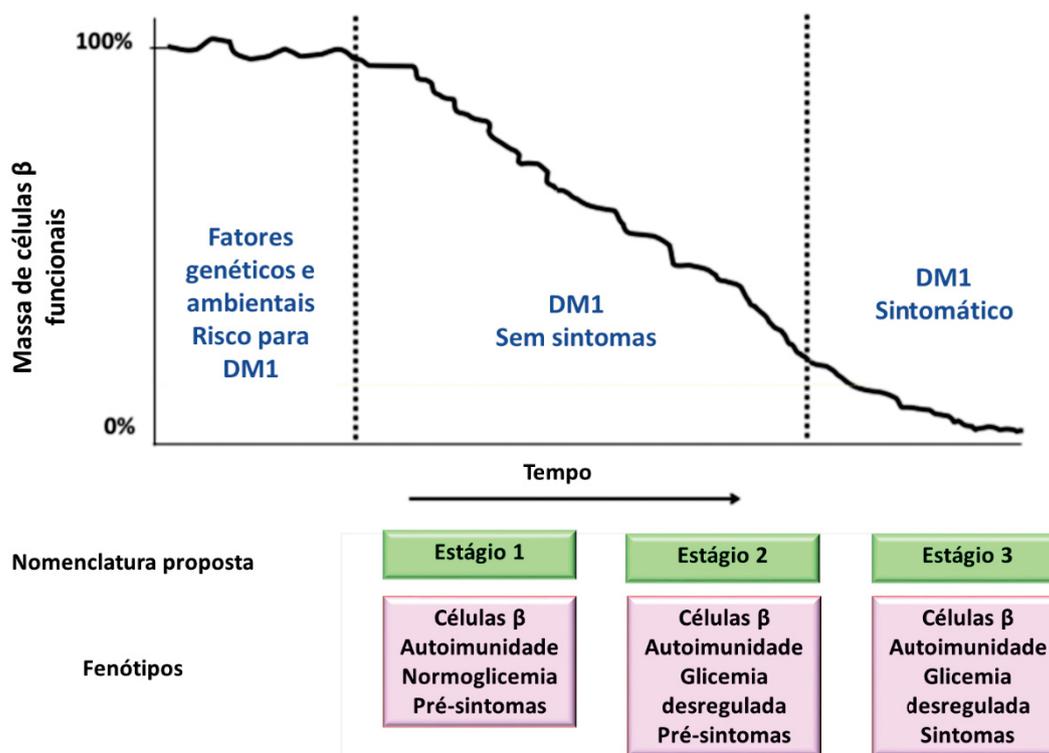
O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença multifatorial crônica com

um forte componente genético (BAKAY *et al.*, 2019) e sua etiologia, como a maioria das doenças crônicas é complexa e resulta da interação de fatores genéticos e ambientais (JERRAM; LESLIE, 2017).

As características patológicas proeminentes do pâncreas no DM1 são a perda de células β e a inflamação das ilhotas. A descoberta de autoanticorpos levou ao reconhecimento de que a autoimunidade pode ser desencadeada mesmo no início da vida do indivíduo e a conversão de autoanticorpos precede os sintomas clínicos em meses e até anos (RODRIGUEZ-CALVO; RICHARDSON; PUGLIESE, 2018).

Desse modo, a história natural da doença se dá início com a perda de células β , que levam a uma redução progressiva de produção de insulina e conseqüentemente ao aumento de glicose no sangue. De acordo com a *Juvenile Diabetes Research Fundação* (INSEL, R.; DUNNE, 2016), desde o início do desenvolvimento da doença com a autoimunidade até os sinais clínicos, podem ser classificados em três principais estágios: 1) autoimunidade assintomática de células β com glicemia normal, 2) autoimunidade β celular assintomática com hiperglicemia e 3) DM1 sintomático (CHIARELLI; GIANNINI; PRIMAVERA, 2019), conforme ilustrado na figura 4.

FIGURA 4. ESTÁGIOS DO DM1.

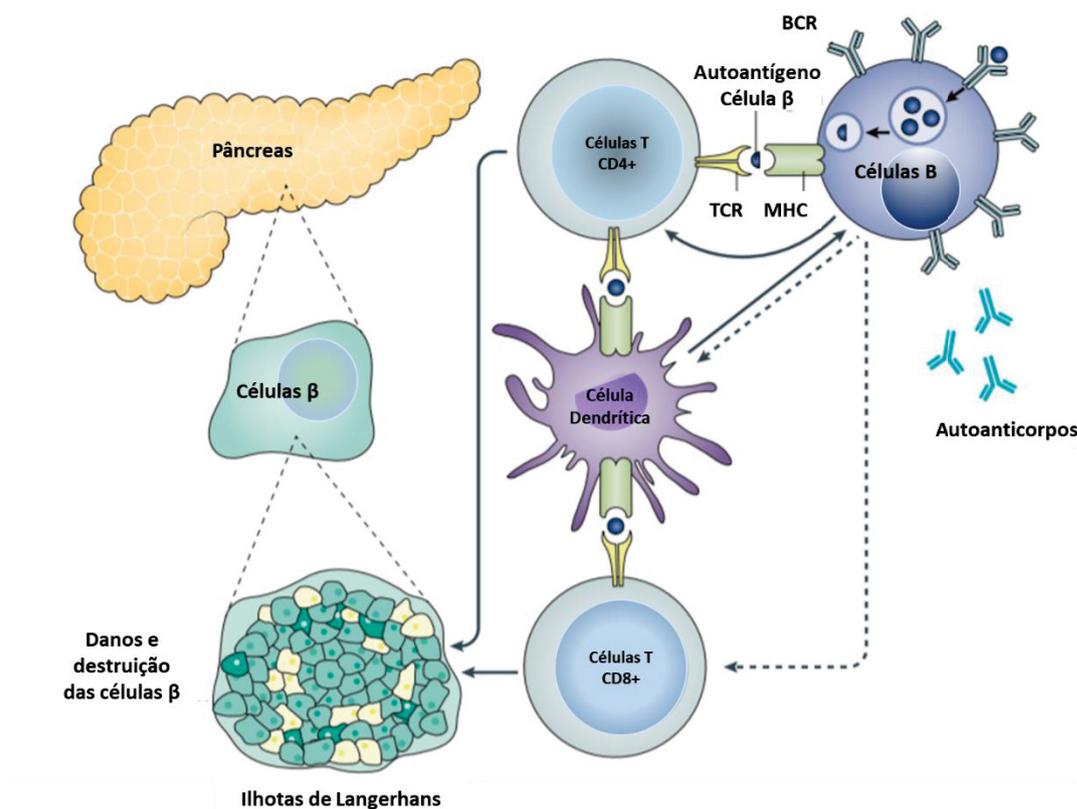


Estágio 1: autoimunidade das células β , concentração normal de glicose, sem sintomas. Estágio 2: autoimunidade das células β , concentração de glicose desregulada, sem sintomas. Estágio 3: autoimunidade das células β , diminuição da concentração de glicose no sangue e aparecimento dos sintomas.

Fonte: adaptado de Insel e Dunne, 2016 e Chiarelli e colaboradores, 2019.

Interações entre células T e células B ocorrem e podem levar à formação de autoanticorpos (WONG, 2014), conforme figura 5. O evento que desencadeia o aparecimento do primeiro autoanticorpo contra as ilhotas é desconhecido, porém ocorre a apresentação de autoantígenos por células dendríticas e respostas subsequentes de células T $CD4^+$ específica ao autoantígeno e células T $CD8^+$, sendo essas células, específicas para autoantígenos de células β , detectáveis em pacientes no início da doença, antes mesmo da apresentação dos sintomas (OLING *et al.*, 2012; ROEP; PEAKMAN, 2012).

FIGURA 5. PATOGÊNESE DO DM1.



No DM1, uma doença imunomediada, as células B ativadas interagem com células T CD4⁺ e CD8⁺, bem como células dendríticas. A apresentação do antígeno pelas células B e células dendríticas conduz a ativação de células T específicas para células β. Além disso, a exposição de células B a autoantígenos de células β leva à produção de autoanticorpos direcionados a ilhotas, que servem como biomarcadores, pois estão presentes na forma assintomática da doença. As setas tracejadas indicam os potenciais interações entre as células B e Células T CD8⁺, e entre células B e células dendríticas.

BCR: receptor de células B; TCR: receptor de células T; MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade.

Fonte: Adaptado de Katsarou e colaboradores, 2017.

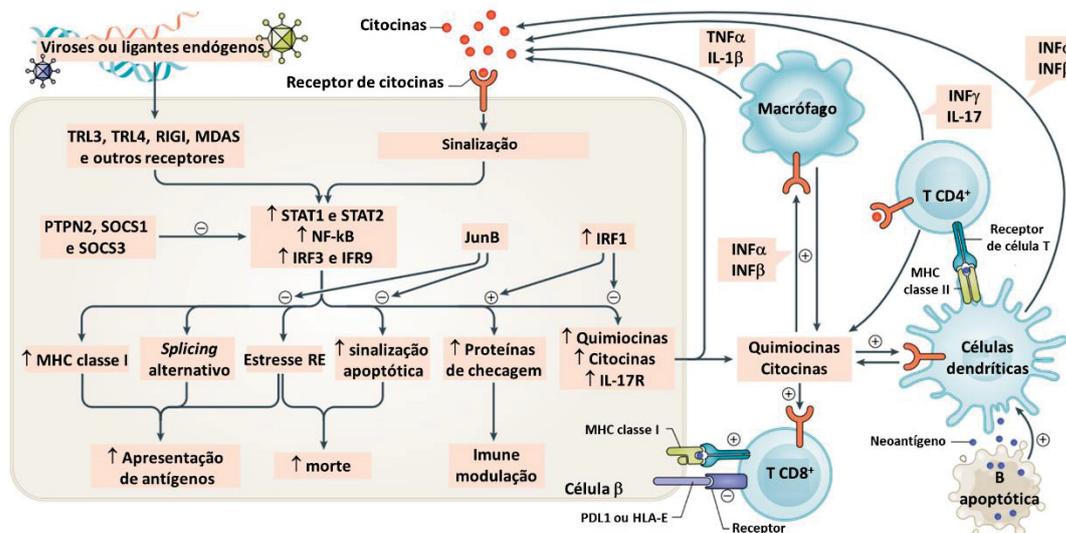
Os gatilhos que causam a resposta auto-imune que acabará por levar ao desenvolvimento do DM1 precisam ainda serem determinados. No entanto, é chamara atenção que muitos dos genes candidatos para a doença expressa a nível das células β (> 80% de todos genes candidatos identificados) codificam proteínas que regulam a detecção de subprodutos virais, uma etapa crucial na a resposta antiviral imune inata (OP DE BEECK; EIZIRIK, 2016). Curiosamente, a exposição das células β humanas ao interferon alfa (*Interferon alpha* - IFNα), sozinho ou em combinação com interleucina 1 β (IL-1β), induz várias das marcas registradas observadas em as ilhotas de pacientes afetados pelo DM1 (MARROQUI *et al.*, 2017). Polimorfismos que diminuem a expressão ou função da tirosina quinase 2 (*tyrosine kinase 2* - TYK2), uma quinase que transduz a sinalização a jusante do receptor IFNα, são protetores contra DM1 (OP DE

BEECK; EIZIRIK, 2016)Essas descobertas sugerem que prevenindo uma resposta inflamatória excessiva após exposição da ilhota a vírus ou outros sinais de perigo pode diminuir o risco de (OP DE BEECK; EIZIRIK, 2016). Em linha com esta sugestão, novos inibidores de TYK2, que estão em ensaios clínicos para outras doenças autoimunes, proteja as células β humanas contra os efeitos deletérios do IFN α (COOMANS DE BRACHENE *et al.*, 2020). IFN α e outras citocinas pró-inflamatórias também induzem a expressão pelas células β de moléculas protetoras que diminuem as atividades das células T e naturais killer (*Natural Killer* - NK), nomeadamente ligante de morte celular programada 1 (*programmed cell death ligand 1* - PDL1) e antígenos leucocitários humanos E (*human leukocyte antigen* - HLA-E (COLLI *et al.*, 2020), o que indica que a célula β tenta transformar seu diálogo com o sistema imunológico em vias menos perigosas (Figura 6). O fato de que as terapias contra o câncer com base na inibição de PDL1 e/ou PD1 levam ao desenvolvimento do DM1 em 1–2% dos pacientes, reforça o papel desta molécula como um protetor de células β (EIZIRIK; PASQUALI; CNOP, 2020).

A maioria dos pacientes ainda tem uma quantidade considerável de células β no diagnóstico de DM1, com alguns pacientes tendo até 40-50% da massa média de células β observada em indivíduos sem DM1(EIZIRIK; PASQUALI; CNOP, 2020).

Além disso, as células β residuais permanecem em até 80% dos pacientes, mesmo após mais de 20 anos de doença (EIZIRIK; PASQUALI; CNOP, 2020).Estas células β sobreviventes são disfuncionais, pois sintetizam a pró-insulina, mas são incapazes de convertê-la em insulina funcional (ORAM; SIMS; EVANS-MOLINA, 2019), que provavelmente é secundário à exposição a mediadores inflamatórios (HOSTENS *et al.*, 1999).

FIGURA 6 UMA VISÃO ATUALIZADA DO DIÁLOGO ENTRE AS CÉLULAS B E O SISTEMA IMUNOLÓGICO.



Um diálogo equivocado entre as células β e as células do sistema imunológico contribui para desencadeamento e amplificação da insulite e a morte progressiva das células β . Reconhecimento de "sinais de perigo" endógenos e exógenos por receptores de reconhecimento de padrões leva à ativação de fatores de transcrição, como NF- κ B, STATs, IRF3 e IRF9. Esses fatores de transcrição regulam a produção de quimiocinas que atraem e ativam as células do sistema imunológico. Citocinas liberadas pelas células imunes invasoras aumentam a expressão de moléculas de classe I MHC que apresentam antígenos em células β , que, quando associadas com mudanças no *splicing* alternativo ou estresse do retículo endoplasmático (ERE), pode levar à apresentação de neoantígenos às células imunes e ativação de apoptose. Sinais das células β mortas juntamente com apresentação de antígeno por células apresentadoras de antígeno leva à ativação de células T autorreativas. Durante a insulite, as citocinas pró-inflamatórias são liberadas pelas células imunes e ativam fatores de transcrição nas células β que mantêm e amplificam o círculo vicioso descrito acima, resultando na perda progressiva das células β . Por outro lado, alguns fatores de transcrição (como JunB ou IRF1) ou proteínas de ponto de controle imunológico (PDL1 e HLA-E) podem diminuir a inflamação e danos imunomediados. +, estimulação; -, inibição.

Fonte: Adaptado de Eizirik e Colli (2020)

Contudo, ainda permanecem muitas incertezas em relação ao destino das células β no DM1, o que dificulta o desenvolvimento de novas terapias para DM1. Por exemplo, a taxa de perda das células β no DM1 é desconhecida. Além disso, como algumas células β conseguem sobreviver às necessidades contínuas da resposta autoimune precisa ser determinado. Porque essas células são suprimidas funcionalmente ou produzem pró-insulina sem serem capazes de converter em insulina madura também precisa ser esclarecido. Se esta supressão pode ser revertida para restaurar a produção clinicamente relevante da insulina também precisa ser investigado (EIZIRIK; COLLI, 2020).

Outra questão envolve determinar os endotipos de DM1. Se é possível que alguns desses endotipos são causados principalmente por defeitos inerentes das células β , uma falha do sistema imunológico ou uma combinação

de ambos os fatores precisa ser esclarecido. Além disso, o papel da maioria dos *loci* candidatos para DM1 ainda é desconhecido. Além disso, se a geração induzida por inflamação de neoantígenos é um fator causal primário no DM1 ou apenas um componente da fase de amplificação da autoimunidade precisa ser investigado. Além disso, a natureza dos mecanismos de defesa desencadeados pelas células β durante a insulite e porque eles falham em prevenir a morte das células β a medida que a doença evolui em muitos pacientes precisa de esclarecimentos. Por último, mas não menos importante, se as terapias com o objetivo de proteger ou restaurar as células β durante o curso da insulite fornecerão benefício quando combinado com tentativas contínuas de ter como alvos o sistema imunológico precisa ser determinado (EIZIRIK; COLLI, 2020).

2.2 COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS AO DM1

Vários mecanismos têm um papel na patogênese das complicações micro e macrovasculares. Está bem estabelecido que a hiperglicemia é o principal fator de complicações diabéticas (Figura 7). O aumento da contração de glicose plasmática intracelularmente induz várias vias metabólicas em um ciclo vicioso resultando em dano crônico ao tecido. Dentro da célula, a superprodução mitocondrial de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) como o radical ânion superóxido, peroxinitrito e peróxido de hidrogênio é o evento-chave secundário à sobrecarga de glicose (DE *et al.*, 2013). ERON, por sua vez, induzem danos ao DNA e, conseqüentemente, superestimula a poli (ADP-ribose) polimerase (*poly-ADP ribose polymerase* - PARP), uma enzima de reparo que induz o consumo de NAD e diminuição o gliceraldeído 3-fosfatodesidrogenase (GAPDH). Isto resulta na desregulação e iniciação de sinais pró-apoptóticos, como formação de produtos finais de glicação (*advanced glycation end products* - AGEs). Durante a hiperglicemia de longa data em diabéticos, glicose forma ligações covalentes com proteínas por meio de uma reação não enzimática entre o grupo amino livre de um aminoácido e o grupo carbonila dos açúcares redutores. A produção de AGEs leva à alteração estrutural e funcional de proteínas, tanto na matriz extracelular e no espaço intracelular. AGEs também pode interagir com receptores específicos (RAGEs), que criam uma cascata pró-

inflamatória complexa (envolvendo IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β e VCAM-1) e aumentando o estresse oxidativo (DE *et al.*, 2013).

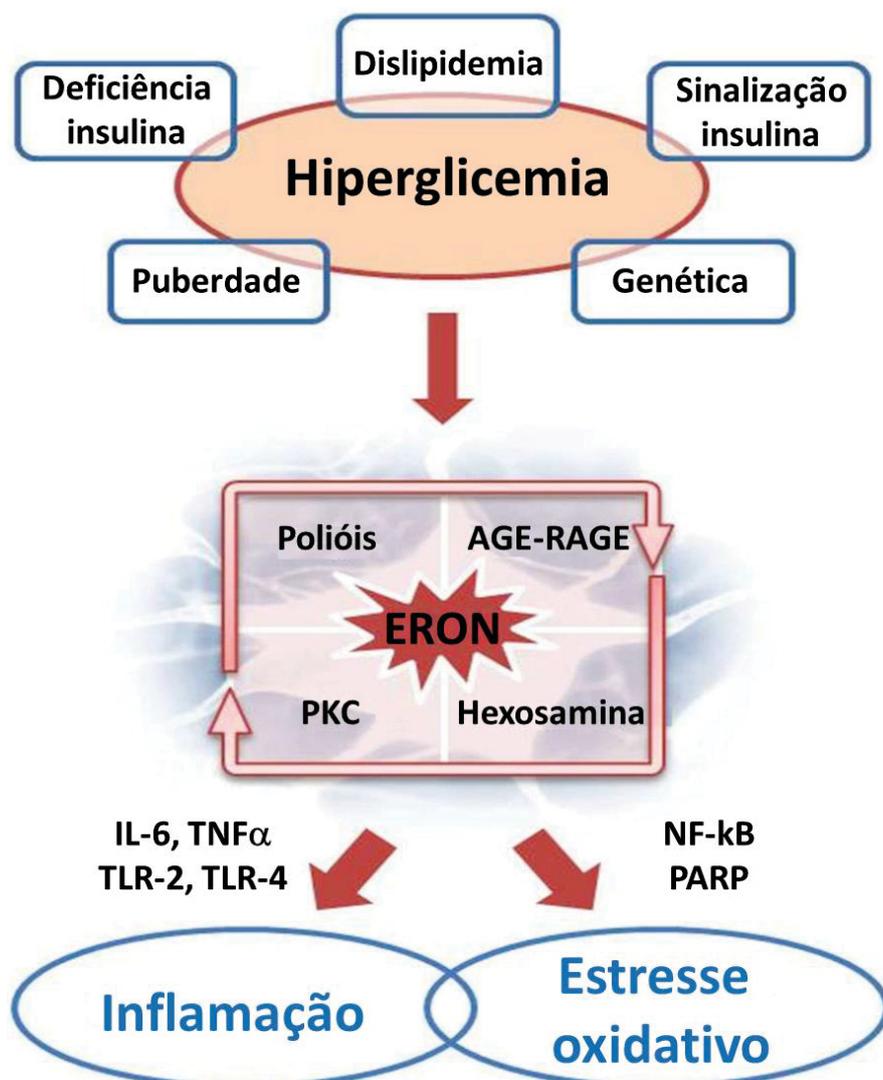
As vias da proteína quinase C (*protein kinase C* - PKC) e da hexosamina são, portanto, aumentadas pelo meio celular prejudicado, respectivamente, resultando na produção adicional de ERON por meio do complexo NADPH oxidase, e na transcrição de fatores de comprometimento vascular, como Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (*plasminogen activator inhibitor-1* - PAI-1, fator de crescimento transformante alfa (*transforming growth factor alpha* - TGF- α) e TGF- β (50).

Além disso, a glicose em excesso é convertida em polióis, principalmente sorbitol, cujo fluxo aumentado consome NADPH, envolvido na regeneração antioxidante. O acúmulo de polióis também inibe a Na⁺/K⁺ ATPase, interagindo assim com a via de PKC.

A doença cardiovascular (DCV) é uma complicação bem conhecida da diabetes e constitui a principal causa de mortalidade entre indivíduos com diabetes tipo 1 (DM1) (MORRISH *et al.*, 2001; NATHAN *et al.*, 2005; ROGLIC *et al.*, 2005) com um risco 10–29 vezes maior de mortalidade por DCV em comparação com controles saudáveis (DORMAN *et al.*, 1984; KROLEWSKI *et al.*, 1987; MOSS; KLEIN; KLEIN, 1991; LAING *et al.*, 2003). A aterosclerose inicia na infância, sendo mais prevalente e agressiva em jovens com DM1 (WADWA, 2006; ORCHARD; COSTACOU, 2010; SNELL-BERGEON; NADEAU, 2012; TRUONG; MAAHS; DANIELS, 2012). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos subjacentes ao risco de DCV ou seus marcadores precoces em jovens com DM1, dificultando os esforços de prevenção precoce. Enquanto os estudos de DCV em adultos avaliam desfechos, como infartos do miocárdio, medidas substitutas disponíveis mais comumente avaliadas em jovens são marcadores tradicionais, incluindo lipídios e pressão arterial. Embora dislipidemia seja comum em crianças com DM1 (KERSHNAR *et al.*, 2006; SCHWAB, K. O. *et al.*, 2006; GUY *et al.*, 2009; ORCHARD; COSTACOU, 2010), DM1 pode, mesmo na presença de concentrações normais de lipídios, estar associado a perfis lipídicos mais aterogênicos (ORCHARD *et al.*, 1999; COLHOUN *et al.*, 2002; KORNERUP *et al.*, 2003; ALBERS *et al.*, 2008), que são fortes preditores de incidentes de DCV em adultos (ST-PIERRE *et al.*, 2001;

RIZZO; BERNEIS, 2006), e, DCV futura em crianças (LI, S. *et al.*, 2003; RAITAKARI *et al.*, 2003).

FIGURA 7. PATOGÊNESE DAS COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS: O PAPEL DA HIPERGLICEMIA COMO O CAUSA DA INFLAMAÇÃO E DO ESTRESSE OXIDATIVO.



Abreviações: AGE: produtos finais de glicação; RAGE: receptor de produtos finais de glicação; ERON: espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; PKC: proteína quinase C; IL-6: interleucina 6; TNF α : fator de necrose tumoral alfa; TLR-2: receptores do tipo Toll (*toll like receptor 2*); TLR-4: receptores do tipo Toll (*toll like receptor 4*); NF-kB: fator nuclear kapa beta; PARP: poli (ADP-ribose) polimerase.

Fonte: Adaptado de Verrotti e colaboradores (2014)

Os mecanismos responsáveis pelo aumento da aterosclerose e DCV em pacientes com DM1 ainda não foram completamente elucidados. O controle glicêmico deficiente é o principal fator de risco modificável para DCV no DM1, conforme claramente destacado pelos resultados de os estudos DCCT/EDIC e

outros estudos mais recentes (URBINA *et al.*, 2019). No entanto, outros fatores de risco cardiometabólico tradicionais, como obesidade, hipertensão e dislipidemia; fatores de estilo de vida, tais como tabagismo e sedentarismo, e comorbidades como microalbuminúria, hiperfiltração/declínio na função renal podem todos contribuir de forma independente e aditiva para o risco geral a DCV (URBINA *et al.*, 2019). No entanto, como o risco CV permanece alto, mesmo quando tais fatores estão sob controle, outros mecanismos provavelmente estão envolvidos. Certos mecanismos subjacentes que promovem aterosclerose e DCV, como potencial resistência à insulina (ou seja, em adolescentes e aqueles com obesidade coexistente), inflamação, estresse oxidativo e disfunção endotelial, podem ser denominadores comuns entre diferentes fatores (VERGES, 2020a).

Está bem estabelecido que a resistência à insulina aumenta o risco de DCV no DM1 (NADEAU *et al.*, 2010; PURNELL *et al.*, 2017). Embora os pacientes com DM1 frequentemente têm perfis normais de lipoproteína, diminuição da sensibilidade à insulina durante a adolescência e idade adulta associada com concentrações mais elevadas de triglicerídeos e um perfil de lipoproteína mais aterogênica (MAAHS *et al.*, 2011). Um estudo prospectivo de 603 pacientes com DM1 envolvido na Epidemiologia do Diabetes de Pittsburgh Estudo de complicações descobriu que a resistência à insulina (mas não glicemia) foi positivamente associada ao risco de DAC eventos (ORCHARD *et al.*, 2003). Resistência à insulina, síndrome metabólica e DM2 são classicamente associados com diminuição HDL-C. Embora os indivíduos com DM1 tenham resistência à insulina, paradoxalmente, o HDL-C é frequentemente maior em pessoas com DM1 do que em controles não diabéticos [6,7]. No entanto, crescentes evidências sugerem que HDL no DM1 pode se tornar disfuncional e pró-aterogênico, ao invés de cardioprotetor (GANJALI *et al.*, 2017; HEIER *et al.*, 2017; GOURGARI *et al.*, 2018; LLAURADO *et al.*, 2019). No entanto, há muitas perguntas sem resposta sobre a interação entre apolipoproteínas, sensibilidade à insulina e risco de DCV no DM1.

Como a DCV raramente se apresenta na infância ou adolescência, os pesquisadores estão procurando marcadores precoces de risco aumentado de DCV em jovens com DM1. Um estudo recente mostrou que os fatores genéticos estão associados ao risco de DCV subsequente em indivíduos com DM1 acima

e além do efeito de fatores de risco estabelecidos, como idade, lipídios, pressão arterial e glicemia (BEBU *et al.*, 2021).

2.3 GENES CANDIDATOS PARA DM1

A suscetibilidade genética desempenha um importante papel na etiologia do DM1. Marcadores genéticos específicos na região HLA levam ao aumento da suscetibilidade ao DM1 (NOBLE *et al.*, 1996). Outros genes fora a região HLA têm sido associados ao DM1 e autoimunidade (BELL; HORITA; KARAM, 1984; KLITZ *et al.*, 2002; STECK *et al.*, 2005). Uma parte substancial do risco genético do DM1 permanece inexplicado). Através do notável progresso na genética humana, dezenas de novos alelos de risco que contribuem à probabilidade de desenvolvimento de DM1 foram identificados na última década (POCIOT; LERNMARK, 2016). Infelizmente, para a maioria deles, os mecanismos moleculares de ação permanecem indefinidos. Contudo, tornou-se claro que muitos dos genes associados aos polimorfismos nucleotídeo único (SNPs) que conferem risco são expressos em células β pancreáticas (BERGHOLDT *et al.*, 2012; EIZIRIK *et al.*, 2012), levantando a possibilidade emocionante de que uma fração significativa do risco do DM1 é determinada pelo transcriptoma de células β que controla a função, sobrevivência e interação das células β com o sistema imunológico.

Mapeamento genético fino, estudos de correlação genótipo-fenótipo, bem como experimentos funcionais têm sido empregados para identificar as variantes causais e genes que atuam ao nível das células β . Além disso, várias abordagens de biologia de rede e de sistemas foram aplicadas para compreender os mecanismos subjacentes à destruição das células β no DM1. Essas análises têm se mostrado valiosas para priorizar genes associadas as doenças, e para fornecer informações sobre os possíveis mecanismos por análises das vias envolvidas (HU, J. X.; THOMAS; BRUNAK, 2016). Estudos de perda e ganho de função em sistemas modelo de células β já forneceram um conhecimento importante da função de uma série de genes candidatos para o DM1 e suas vias. Estas observações sugerem que poucas vias principais reguladas geneticamente contribuem para a disfunção e morte das células β no

DM1, por exemplo, imunidade inata e atividade antiviral e vias relacionadas ao fenótipo e suscetibilidade das células β aos estímulos pró-apoptóticos (FLOYEL; KAUR; POCIOT, 2015; SANTIN; DOS SANTOS; EIZIRIK, 2016).

A identificação de genes específicos e os mecanismos subjacentes envolvidos na destruição das células β é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para melhorar a função das células β no início do DM1 recente e para evitar o comprometimento das células β em indivíduos de risco (STORLING; POCIOT, 2017).

A maioria das variantes associadas à doença tem pequenos efeitos individuais no risco de doença e são, portanto, insuficiente para prever o desenvolvimento da doença ou fornecer benefício diagnóstico imediato (BARRETT *et al.*, 2009; POCIOT *et al.*, 2010). Por isso, a análise funcional das variantes de risco é a abordagem mais promissora para determinar os significados exatos da variação associada na patogênese da doença e para definir seu potencial translacional (STORLING; POCIOT, 2017).

Curiosamente, mais de 75% dos polimorfismos do estudo de associação amplo do genoma (*genome-wide association study* - GWAS) associado à doença foram mapeados em elementos regulatórios funcionais fora das sequências de codificação de proteínas de acordo com a Enciclopédia do projeto Elementos de DNA (*Encyclopedia of DNA Elements* - ENCODE) (SCHAUB *et al.*, 2012; CORRADIN *et al.*, 2014). Assim, parece que as variantes genéticas que modulam a expressão dos genes, ao invés da sequência da proteína, constituem para a base primária da predisposição genética à doença (STORLING; POCIOT, 2017).

2.3.1 Gene Superoxide dismutase 2, mitochondrial

Em condições fisiológicas normais, há equilíbrio entre a geração de oxidantes e mecanismo de defesa celular antioxidante. Diferenças entre a proporção de antioxidantes para a produção de oxidantes, ou seja, espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). ERO são os metabólitos reduzidos do oxigênio molecular. Esses os produtos são o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion hidroxila (OH^-) e radical hidroxila ($\cdot OH$) (SCHIEBER; CHANDEL, 2014) ERN são a superprodução

de óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) e dióxido de nitrogênio ($\bullet\text{NO}_2$) ou peroxinitrito (ONOO_2), que é formado a partir da interação entre NO e superóxido. Para combater ERRO e ERN, ambos mecanismos de defesa não enzimáticos e enzimáticos estão envolvidos. Os antioxidantes enzimáticos incluem superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase e peroxirredoxinas. Os antioxidantes não enzimáticos incluem carotenóides, ácido ascórbico, zinco e riboflavina. Assim, se um desequilíbrio entre as espécies reativas não é neutralizado por esses mecanismos de defesa, oxidação de moléculas como DNA, lipídios, proteínas e carboidratos persiste, levando à disfunção e morte celular (CHIRICO; PIALOUX, 2012)

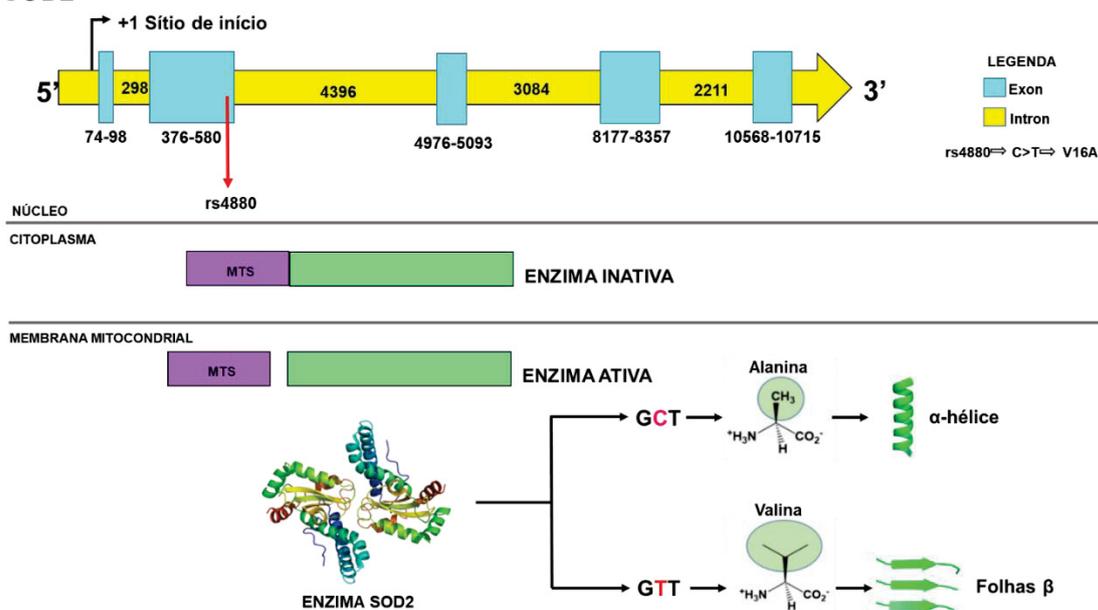
As enzimas superóxido dismutase (SOD) são uma família de proteínas antioxidantes enzimáticas que incluem 3 isoformas, todas com atividades semelhantes, que foram identificadas e descritas em mamíferos: SOD cobre-zinco (SOD1), SOD manganês (SOD2) e SOD extracelular (SOD3). Essas enzimas se especializaram na eliminação do estresse oxidativo por meio da rápida (eficiência catalítica de $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) dismutação dos radicais ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-} + \text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$) (BORGSTAHL *et al.*, 1992; MIAO; ST CLAIR, 2009). O peróxido de hidrogênio é então catalisado à água pela catalase, peroxirredoxinas ou glutathione peroxidases. As 3 isoformas diferem em posição cromossômica, codificação gênica, estrutura proteica, localização celular e requisitos de cofator (MIAO; ST CLAIR, 2009).

A SOD2 é transcrita do gene *SOD2* e traduzida como um homotetrâmero; 23-kDa simetricamente montado a partir de pares de *hairpins* helicoidais N-terminais (Figura 9). Os *hairpins* helicoidais N-terminais juntamente com os domínios α/β C-terminais contribuem com ligantes para a formação do sítio de catalítico com manganês dentro de cada subunidade (BORGSTAHL *et al.*, 1992). SOD2 é sintetizada no citoplasma e localizado na matriz mitocondrial, onde elimina e acelera a dismutação do ânion superóxido gerado pelas enzimas da cadeia respiratório (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011).

O gene *SOD2* humano está localizado na banda q25.3 do cromossomo 6 consistindo em cinco exons interrompidos por quatro introns com junção de *splicing* típica (WAN; DEVALARAJA; ST CLAIR, 1994). O gene não é codificado pelo DNA mitocondrial, mas sim no DNA nuclear, sendo a enzima translocada

para a mitocôndria após a tradução da proteína no citosol. A enzima homotetramérica de 88 kDa possui uma sequência líder mitocondrial na região N-terminal (*Mitochondrial targeting sequence* - MTS), que orienta a molécula para o interior da mitocôndria (SHIMODA-MATSUBAYASHI *et al.*, 1996). Após o transporte, a região MTS é clivada, tornando a enzima funcional (SUTTON *et al.*, 2003), onde elimina e acelera a dismutação do ânion superóxido gerado pelas enzimas da cadeia respiratório (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011). O tetrâmero é simetricamente montado a partir de pares de *hairpins* helicoidais N-terminais de cada monômero (FIGURA 8). Os *hairpins* helicoidais N-terminais juntamente com os domínios α/β C-terminais contribuem com ligantes para a formação do sítio de catalítico com manganês dentro de cada subunidade (BORGSTAHL *et al.*, 1992).

FIGURA 8 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E EFEITO DO POLIMORFISMO RS4880 DO GENE SOD2



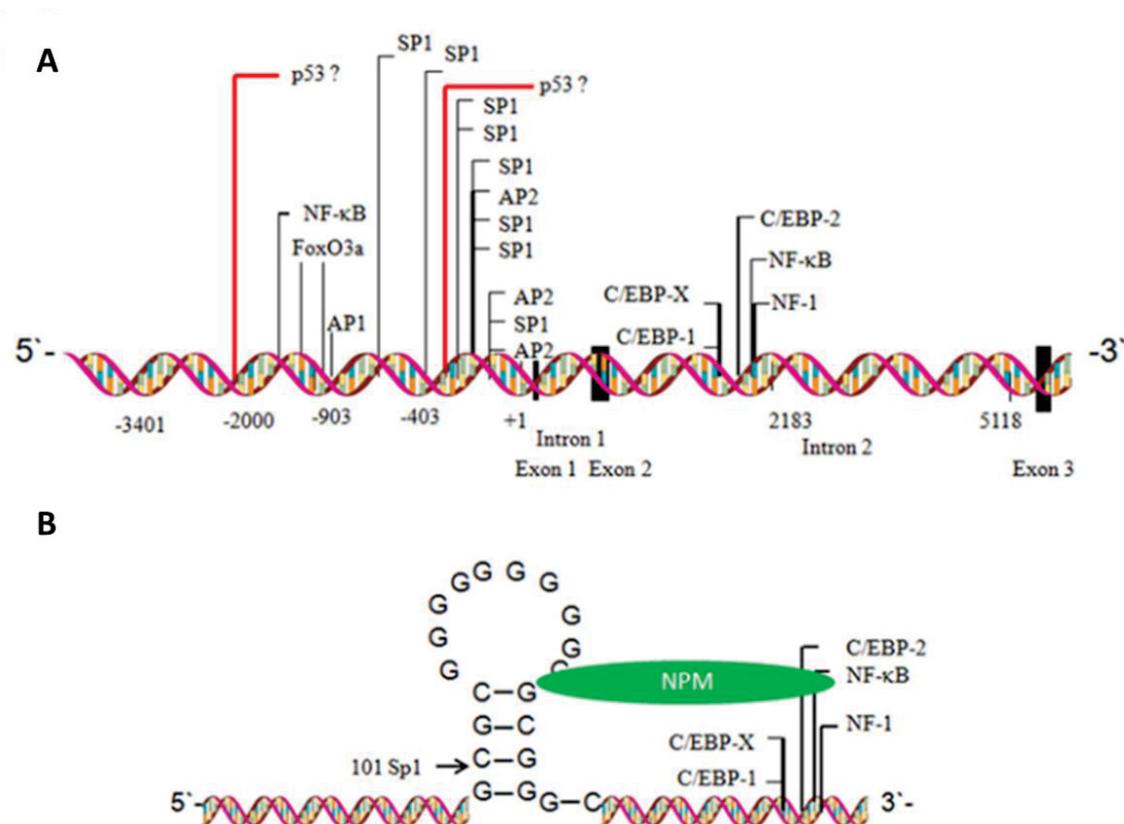
O tamanho e localização de cada exon em termos de pares de bases de DNA é mostrado usando o sítio de início de transcrição como +1. O polimorfismo rs4880, do gene *SOD2*, envolve a troca alélica C para T, que resulta na substituição da Valina pela Alanina no códon 16 (V16A). No citoplasma a enzima *SOD2* permanece inativa, tornando-se ativa, ao passar pela membrana mitocondrial, e sofrer a clivagem do segmento MTS pelos lisossomos presentes nos poros da membrana. Fenotipicamente, a variante Alanina possui uma estrutura α -hélice e a Valina uma estrutura parcial de folha β .

Fonte: Adaptado de Dhar e St Clair (2012) e Cruz e colaboradores (CRUZ *et al.*, 2018)

O gene *SOD2* contém elementos intensificadores (*enhancers*) no segundo intron do gene (JONES, P. L.; PING; BOSS, 1997; XU, Y. *et al.*, 1999). Tanto a região promotora como o intensificador do gene *SOD2* contém vários

motivos de ligação a fatores de transcrição, que por sua vez se ligam com diferentes fatores de transcrição e iniciam a transcrição do gene (FIGURA 9). Entre estes motivos encontram-se: motivos ricos em GC, um sítio de ligação FOXO3 (*Forkhead box O3A*), um elemento regulatório do fator nuclear kapa beta (*factor nuclear kappa B* - NF-kB) e vários sítios específicos para proteína ativadora 1 (*proteína ativadora-1* - AP-2) e proteína ativadora 2 (*proteína ativadora-1* - AP-2) (MIAO; ST CLAIR, 2009). Ativação transcricional da proteína 1 de resposta de crescimento precoce (*early growth response 1* - Egr-1) regula positivamente a expressão de *SOD2* por meio da expressão do fator de crescimento derivado de plaquetas (MAEHARA; OH-HASHI; ISOBE, 2001). Além disso, uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 (IL-1), IL-4, IL-6, fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor-alpha* - TNF α), interferon gama (*Interferon-gama* - IFN γ), e os lipopolissacarídeos de endotoxina bacteriana (*bacterial endotoxin lipopolysaccharide* - LPS), são ativadores robustos de *SOD2* (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002). Em particular, IL-1 e TNF α aumentam a expressão transcricional de SOD de manganês (*SOD2*) em células endoteliais pulmonares de rato, uma resposta que foi exacerbado pela adição de lipopolissacarídeo (VISNER *et al.*, 1992). A regulação negativa de *SOD2* é induzida pelos fatores de transcrição da família AP-2 (KANNAN *et al.*, 1994; ZHU, C. H. *et al.*, 2001). A expressão de *SOD2* também é regulada por ERO e ERN. Aumento de peroxinitrito pode causar nitração na tirosina 34 levando a inibição enzimática (REDONDO-HORCAJO *et al.*, 2010), enquanto os radicais superóxido aumentam a expressão de *SOD2* através da ativação pelos fatores de transcrição NF-kB e fator nuclear derivado de eritróide 2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2* - Nrf2) sensíveis a redox (AKASHI *et al.*, 1995; ARUMUGAM *et al.*, 2019).

FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS REGIÕES REGULATÓRIAS QUE ORIENTAM A EXPRESSÃO DO GENE *SOD2*.



Sítios de ligação dos fatores de transcrição no gene *SOD2*. A. Esquema de vários fatores de transcrição que se ligam aos elementos *upstream* na 5' composta por uma região rica em GC e elemento intensificador (*enhancer*) no segundo intron. Os números positivos e negativos no DNA indicam suas localizações em relação ao local de início da transcrição, denominado como +1. B. Representação hipotética da ligação entre fatores de transcrição de ligação ao promotor e ao intensificador.

Abreviações: p53: fosfoproteína nuclear de 53 kD (*phosphoprotein 53*); NF-κB: fator nuclear kapa beta; FOXO3: *Forkhead box O3A*, AP-1: proteína ativadora 1; SP1: proteína específica 1 (specificity protein 1 – SP1); C/EBP: proteínas Intensificadoras de ligação a CCAAT (CCAAT-enhancer-binding proteins); neurofibromatose do tipo 1 (NF-1); NPM1: nucleofosmina 1.

Fonte: Dhar e St Clair (2012)

A atividade enzimática de *SOD2* é regulada pós-traducionalmente, com fosforilação no resíduo de serina 106 por quinase dependente de ciclina 1 (*cyclin dependent kinase 1* - CDK1), aumentando a atividade enzimática e a sobrevivência celular (CANDAS *et al.*, 2013; ZOU *et al.*, 2017) enquanto a perda de sirtuina 3 (*Sirtuin 3* - SIRT3) leva à acetilação da lisina 122 e da lisina 68 e inibição da atividade enzimática (TAO *et al.*, 2010; CHEN, Y. *et al.*, 2011).

Nas últimas décadas, o estresse oxidativo se tornou um assunto de interesse em na pesquisa clínica (PITOCCO *et al.*, 2010). De fato, foi

demonstrado que o estresse oxidativo contribui para o aparecimento e progressão do diabetes e suas complicações associadas (RAINS; JAIN, 2011) como retinopatia, nefropatia, neuropatia (KURUTAS, 2016), bem como dano macrovascular e microvascular (EVANS *et al.*, 2003).

A gênese do estresse oxidativo é multifatorial, como a exposição sustentada ao estresse ambiental (radiações ultravioleta, fumo, álcool, exposição a poluentes), infecção microbiana, mutagênese genética (dano oxidativo ao DNA e instabilidade do genoma), e explosão respiratória juntamente com reações inflamatórias. O estresse persistente de fatores inflamatórios e ambiente oxidativo causa danos ao epitélio vizinho tecidos, células somáticas saudáveis, aumentando o risco de auto-anticorpos e mutação que leva a mudanças insignificantes no funcionamento fisiológico. Essas mudanças por um longo período de tempo podem levar à patogênese de vários distúrbios auto-imunes por perturbar numerosas vias de sinalização (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Variação genética de antioxidantes pode estar envolvida na progressão da patogênese DM1 (CHISTIYAKOV *et al.*, 2006). Polimorfismos na sequência de direcionamento mitocondrial (MTS) da enzima SOD2 são conhecidos por interromper o direcionamento adequado da enzima do citosol para a matriz mitocondrial, onde desintoxica espécies reativas de oxigênio geradas como um subproduto durante a fosforilação oxidativa (GREGORY; YOST; FRIDOVICH, 1973).

O polimorfismo rs4880, localizado no exon 2 do gene *SOD2* (POURVALI; ABBASI; MOTTAGHI, 2016), no qual ocorre a transição do nucleotídeo T para C, induz a substituição de aminoácidos de valina com alanina na posição 16 (Val16Ala) do peptídeo sinal (MTS) resulta em importação mais eficiente de SOD2 para a matriz mitocondrial (SUTTON *et al.*, 2003), podendo aumentar a capacidade de neutralizar os radicais superóxido (TIAN *et al.*, 2011). Ao passar pelos poros da membrana mitocondrial interna, o segmento de peptídeo MTS é clivado por lisossomas, e os agregados de proteína madura em uma forma ativa tornando-se uma enzima funcional, porém em termos fenotípicos, a variante Ala-SOD2 tem uma α -hélice, sendo assim facilmente importada para a mitocôndria, resultando no aumento da atividade enzimática. A variante Val-SOD2 tem uma estrutura em folha β parcial, o que faz com que seja parcialmente retido no poro

da membrana interna da mitocondrial e, portanto, a atividade enzimática desta variante pode ser 30 a 40% menor do que Ala-SOD2, a variante Ala/Val-SOD2 já tem uma estrutura helicoidal com atividade enzimática intermediária (VATS *et al.*, 2015) (FIGURA 8).

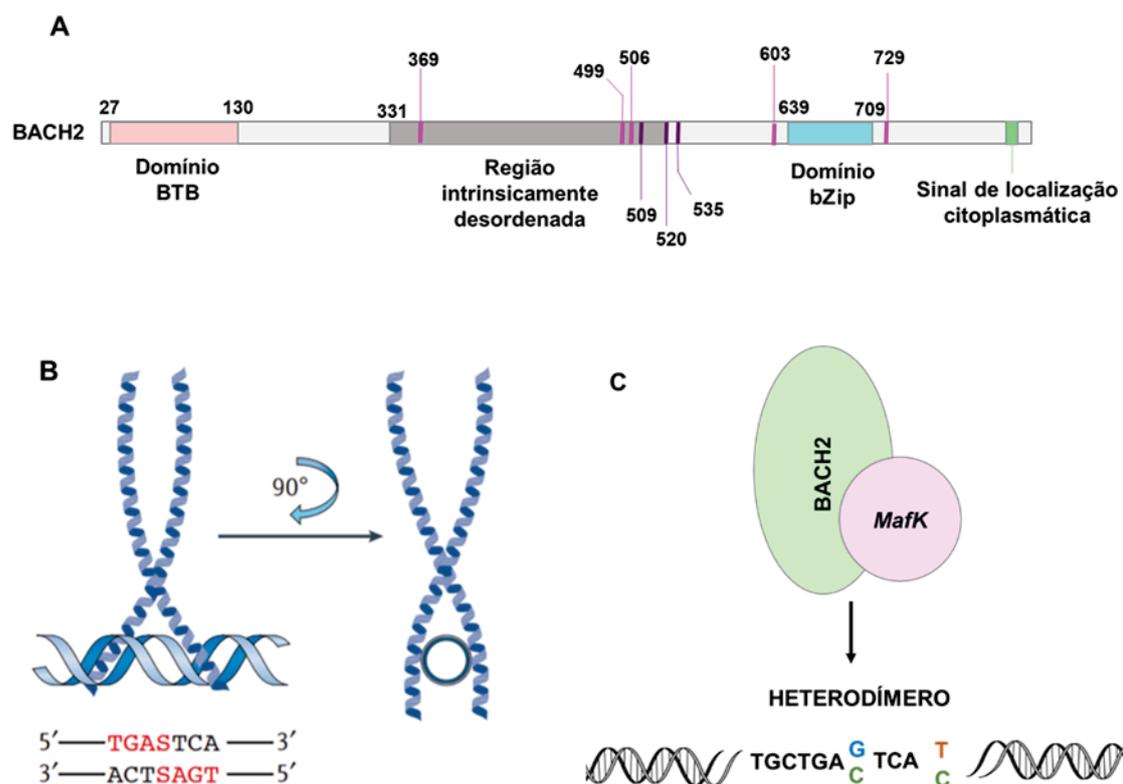
Estudos de Chistyakov e colaboradores (2001), Mollsten e colaboradores (2009) e Mohammadi e colaboradores (2014), demonstraram que a presença do alelo T do rs4880, em pacientes com DM1, leva esses indivíduos a pré-disposição ao desenvolvimento da nefropatia diabética, além da pré-disposição para doenças cardiovasculares (MOLLSTEN *et al.*, 2009) e neuropatia diabética (RICHMAN *et al.*, 1981), o que pode ser explicado devido a diminuição na capacidade antioxidante da enzima causada pela alteração polimórfica (FLEKAC *et al.*, 2008).

2.3.2 Gene broad complex-tramtrack-bric a brac and Cap'n'collar homology 2 (BACH2)

A família domínio BTB e homólogo CNC (*BTB And CNC Homology - BACH*) consiste em BACH1 e BACH2. BACH1, os quais codificam fatores de transcrição que pertencem a família de fatores de transcrição de zíper de leucina básica do tipo Cap'n'Collar (*Cap'n'Collar type of the basic region-leucine zipper factor - CNC-bZip*) (OYAKE *et al.*, 1996; AMOUTZIAS *et al.*, 2007). A proteína de fibrossarcoma musculoaponeurótica (*musculoaponeurotic fibrosarcoma - Maf*) são proteínas bZip que formam dímeros capazes de ativar ou reprimir a transcrição. Bach1 e Bach2 formam heterodímeros com as pequenas proteínas Maf que se ligam ao elemento de reconhecimento Maf (*Maf recognition element - MARE: TGCTGA(G/C)TCAGCA*) para atuar como repressores da transcrição (OYAKE *et al.*, 1996). Além disso, Bach2 liga-se à família de fatores de transcrição de zíper de leucina básico, semelhante a ATF (Batf), e o heterodímero formado por Bach2 e Batf estão funcionalmente relacionados à expressão de IL-4 e função dos linfócitos T auxiliares 2 (*T helper 2 - Th2*) (KUWAHARA *et al.*, 2016). Além disso, as proteínas de Bach possuem um domínio Bricabraque, Tramtrack, Broad-complexo/Poxvírus e Dedos de Zinco (*broad complex, tram track, bric-a-brac/pox-virus and zinc finger - BTB/ POZ*) localizado na região N-terminal (ALBAGLI *et al.*, 1995). Esse domínio é necessaryes para interações com outras proteínas (ALBAGLI *et al.*, 1995;

IGARASHI; WATANABE-MATSUI, 2014) e possui ligação dissulfeto intersubunidade que está relacionada ao estresse oxidativo em humanos (ROSBROOK *et al.*, 2012). A região de ligação ao HEME de Bach1 possui 5 motivos dipeptídicos de cisteína-prolina (CP) (OGAWA *et al.*, 2001). Além disso, Bach contém um sinal de localização citoplasmático (SLC) que está relacionado à exportação nuclear e localização citoplasmática (HOSHINO *et al.*, 2000; SUZUKI, H. *et al.*, 2003; SUZUKI, H. *et al.*, 2004) (Figura 10A).

FIGURA 10: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE BACH2.



A. Representação esquemática das estruturas dos domínios e modificações pós-traducionais de Bach2 de camundongo. Linhas fúscias indicam resíduos de cisteína-prolina; os números indicam a posição de aminoácidos da cisteína. Linhas em roxo indicam os fosfo-resíduos identificados. BTB: domínio Bricabraque, Tramtrack, Broad-complexo/Poxvírus e Dedos de Zinco; bZIP: zíper de leucina básica; SLC: sinal de localização citoplasmático. B. As regiões básicas de cada domínio bZIP ligam-se a sequências semelhantes de DNA no sentido 5' → 3' (conforme destacado em vermelho; S representa a presença de C ou G) em fitas opostas de DNA, resultando em sítios palíndromo de ligação de dímeros bZIP. C. Representação esquemática do heterodímero formado por Bach2 e fator de transcrição fibrossarcoma musculoaponeurótico K (Musculoaponeurotic fibrosarcoma – MafK), e o motivo de ligação no DNA, elemento de reconhecimento Maf (MARE). As bases nitrogenadas na sequência do DNA podem alterar o transcrito e conseqüentemente o dímero formado.

Fonte: Adaptado de Igarashi, Kurosaki and Roychoudhuri (2017) e Richer, Mark e Lang (2016)

O domínio ZIP contém um sinal de localização nuclear que, em conjunto com o C-terminal nuclear sinal de saída, regula a localização intracelular de Bach2 (RICHER; LANG; BUTLER, 2016). Durante o processo de estresse oxidativo, os sinais de localização citoplasmática induzem o acúmulo de Bach2 no núcleo, levando à apoptose (HOSHINO *et al.*, 2000). Em células B, HEME pode se ligar a Bach2 para inibir sua atividade de ligação ao DNA e induzir sua degradação, regulando assim a diferenciação de células plasmáticas e modulando imunidade humoral (WATANABE-MATSUI *et al.*, 2011). Protease específica SUMO 3 (*SUMO-specific protease 3* - SENP3) impede a exportação nuclear de Bach2 catalisando sua desumoição, reprimindo os genes associados a diferenciação das células efectoras T CD4⁺ e estabilizando genes específicos associados às células T regulatórias (Treg) (YU, X. *et al.*, 2018).

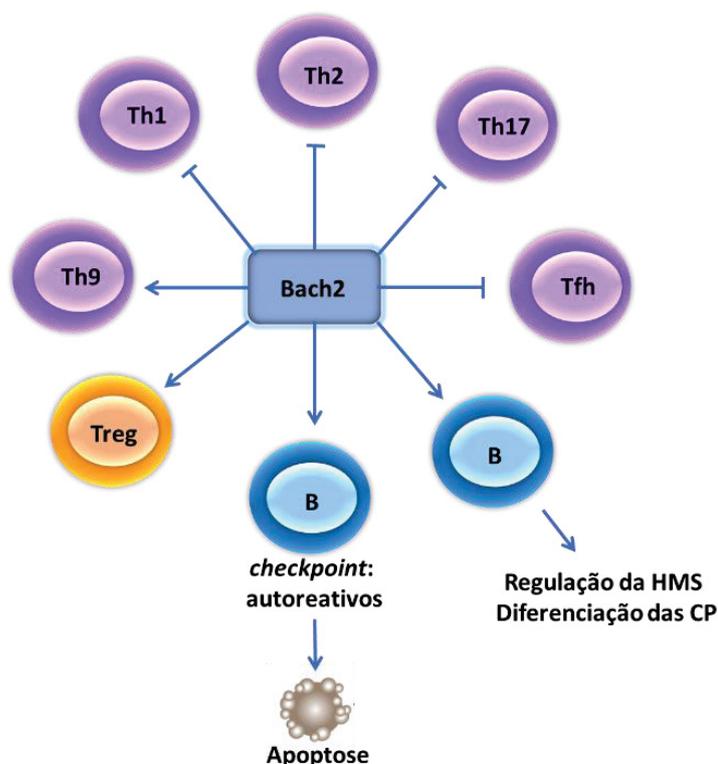
Bach2 é atualmente apenas encontrado em células B, células T, macrófagos alveolares e células neurais. Entre eles, o Bach2 é altamente expresso em células B e a função reguladora nas células B tem sido extensivamente estudado. As células da linhagem B diferenciam-se das células-tronco hematopoiéticas para se tornarem células efectoras do sistema imunológico (ORACKI *et al.*, 2010; NUTT *et al.*, 2011; SHLOMCHIK; WEISEL, 2012). Este processo requer que as células B passem pela reação do centro germinativo (CG), onde as células B completam a hipermutação somática e recombinação de troca de classe para gerar anticorpos de alta afinidade para antígenos (NUTT *et al.*, 2011; SHLOMCHIK; WEISEL, 2012). Nos centros germinativos, essas células B se diferenciam ainda mais em células B de memória e células plasmáticas (CP), que são as células efectoras da imunidade humoral. Este processo é controlado por uma série de fatores de transcrição que mantêm a reação do CG, mas garantem a diferenciação em CP (MUTO *et al.*, 2004; NUTT *et al.*, 2011; IGARASHI; WATANABE-MATSUI, 2014). Bach2 suprime a diferenciação de células B em células plasmáticas ao inibir a proteína-1 de maturação induzida por linfócitos B (*B lymphocyte inducer of maturation program 1* - Blimp-1), que é codificada pelo gene *PRDM1*, estendendo assim o tempo de hipermutação somática e mudança de classe. Após a conclusão dessas duas fases, a expressão de Bach2 é diminuída e as células B finalmente se diferenciam em células plasmáticas (MUTO *et al.*, 2004). Células B sofrem recombinação dos genes que codificam as imunoglobulinas de cadeia pesada e

cadeia leve [49, 50]. Após o rearranjo, aqueles que não conseguem realizar o rearranjo adequadamente são eliminados, enquanto aqueles que tiveram sucesso são reservados. Esse processo é chamado de ponto de verificação (*checkpoint*) do receptor de células pré-B (*pre-B cell receptor* - BCR) (MARTENSSON *et al.*, 2010; ZOUALI, 2014). Os pontos de verificação mediados por pré-BCR têm um papel crítico na seleção negativa e positiva da auto-reatividade (MELCHERS, 2005; ZOUALI, 2014). Foi sugerido que Bach2 participaria dos mecanismos de seleção dos linfócitos B, eliminando os autoreativos através de sua função apoptótica, e que sua mutação poderia levar ao acúmulo de linfócitos autorreativos, resultando eventualmente em doenças autoimunes (HENDRIKS; MIDDENDORP, 2004; MCALLISTER *et al.*, 2013; SWAMINATHAN *et al.*, 2013; ZOUALI, 2014) (Figura 11).

As células T CD4⁺ são fundamentais na promoção ou inibição de patologia imunomediada. Depois de ser estimulada por reconhecimento de antígeno, as células T CD4⁺ ingênuas podem se diferenciar em subconjuntos distintos sob diferentes condições e executam várias funções. As células T efetoras são geralmente associadas com doenças imunomediadas e são principalmente divididas em vários grupos distintos: subconjuntos Th1, Th2, Th9, Th17 e Tfh. Todas elas secretam citocinas, respectivamente, para ajudar a regular respostas imunológicas, especialmente na imunidade adaptativa. Células Th1 aumentam a imunidade anti-infecciosa mediada por fagocitose e inibem a proliferação de células Th2 enquanto os subconjuntos Th2 limitam proliferação de células Th1. As células Th9 atuam em infecções parasitárias, doenças alérgicas, autoimunidade e supressão tumoral, principalmente pela secreção de IL-9. As células Th17 estão envolvidas na inflamação e atuam principalmente nas doenças autoimunes. As células Tfh são o subconjunto que fornece ajuda às células B durante a reação do centro germinativo. Eles são o pré-requisito para a geração de células B de memória e células plasmáticas de alta afinidade. As células T reguladoras Foxp3⁺ (Treg) desempenham um papel importante na limitação respostas inflamatórias e manutenção da homeostase imune por meio da secreção de citocinas ou restrição da ativação da célula alvo por contato direto. As células efetoras são frequentemente associadas a doenças imunomediadas; contudo, as células CD4⁺ Foxp3⁺ Treg suprimem as reações imunológicas. Depois de análise do mapa das células T de camundongos, os

resultados mostraram que citocinas e receptores de citocinas eram da classe dominante de genes em células T que exibem a arquitetura de super-intensificadores (SI) (VAHEDI *et al.*, 2015). Como um repressor de transcrição nas regiões SI, o Bach2 pode regular profundamente o desenvolvimento e a função das células T CD4⁺. Bach2 reprime um conjunto de genes necessários para a função das células T efetoras, inibindo assim a diferenciação de células T efetoras de memória e, portanto, mantendo a homeostase dos subconjuntos de células T (ROYCHOUDHURI *et al.*, 2013; TSUKUMO *et al.*, 2013; KIM, E. H. *et al.*, 2014). Todas essas funções baseiam-se na estrutura de super-potenciadores (SEs). SEs são regiões que possuem uma atividade transcricional intensificada e são predeterminados para atuar no estabelecimento da identidade funcional de subconjuntos de células T. Durante a ativação de células T periféricas, as regiões SE são relatadas como associadas com a regulação das respostas das citocinas. A codificação do *locus* Bach2 emerge como a célula T SE mais proeminente, sugerindo que Bach2 reprime genes associados a SE que são críticos para biologia de células T (VAHEDI *et al.*, 2015) (Figura 11).

FIGURA 11. EFEITO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO BACH2 NA RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA



Bach2 inibe a diferenciação das células Th1. Bach2 inibe alguns genes como *IL12RB1* (*IL12Rβ1*), *IL12RB2*, *MAP3K8* e *GADD45G*, que são essenciais para a diferenciação das células Th1 e, em seguida, inibem a diferenciação de Th1. Bach2 inibe a diferenciação e função das células Th2. Bach2 liga-se ao Batf, e o complexo Bach2-Batf restringe a diferenciação de Th2

por duas vias. O complexo Bach2-Batf liga-se diretamente ao motivo AP-1 na região reguladora do *locus* das citocinas e inibe a produção de citocinas pelas células Th2. O complexo Bach2-Batf também se liga aos *loci* Batf e Batf3 para inibir suas transcrições, enquanto Batf3 regula a função Th2. Bach2 promove a secreção de citocinas associadas a Th9. Bach2 promove a produção de IL-9 em células Th9 ligando-se diretamente ao gene *IL9* e indiretamente por regulação positiva da expressão de fatores de transcrição que induzem a expressão de IL-9, como Batf, Irf4, Junb e Jun. Bach2 inibe a diferenciação das células Th17. S100A é um alvo direto de Bach2. S100A fortalece a severidade inflamatória e a diferenciação de Th17. Bach2 inibe a diferenciação Th17 através da ligação a S100A. Bach2 inibe a diferenciação de Tfh. Bach2 desloca o complexo de Irf-4 e Batf que ativa o promotor Bcl-6. Bach2 também é suprimido por Bcl-6 por sua vez. Bach2 desregula diretamente a transcrição de Cxcr5, o receptor de quimiocina de Tfh. Bach2 promove a diferenciação das células Treg. O fator de transcrição Blimp-1 inibido por Bach2 pode limitar a diferenciação de células T CD4⁺ em células Treg. Além disso, muitos genes que o Bach2 inibe podem codificar proteínas de sinalização que antagonizam a diferenciação de células Treg, incluindo IL12RB1, IL12RB2 e TNFSF4. Além disso, o Bach2 desempenha um papel indispensável na manutenção da homeostase e função das células Treg. E Bach2 é necessário para a expressão completa de Foxp3, em que os efeitos imunomoduladores das células Treg dependem. A expressão de Bach2 ocorre principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento das células B. Assim, a função apoptótica de Bach2 pode estar relacionada aos pontos de verificação mediados pelo receptor de células pré-B (pré-BCR). O Blimp-1 codificado pelo gene *PRDM1* serve como um repressor da transcrição para a diferenciação terminal das células B. Bach2 retarda a diferenciação das células B às CP do centro germinativo, aumentando a janela de tempo da hipermutação somática (HMS) e a recombinação de troca de classe (RTC). Quando a HMS e a RTC forem concluídas com sucesso, a expressão Bach2 é reduzida, e as células B ativadas começam a expressar Blimp-1.

Fonte: Adaptado de Zhou e colaboradores (2016) e Yang e colaboradores (2019)

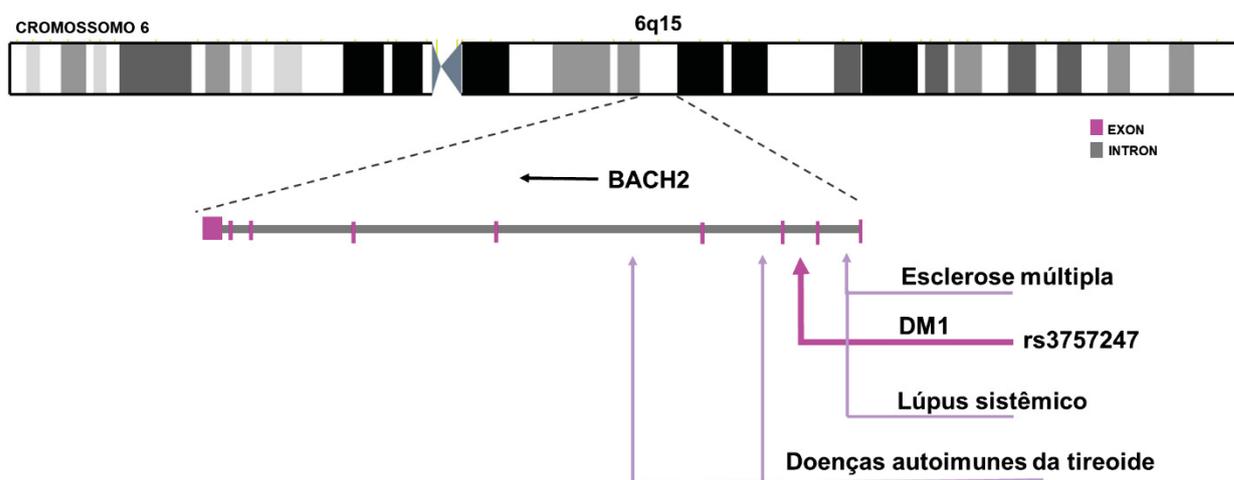
O gene *BACH2* está localizado no cromossomo humano 6 (6q15), sendo composto por 9 éxons e 8 introns, codificando uma proteína com 741 aminoácidos, tendo seus domínios funcionais altamente conservados (YANG *et al.*, 2019) (Figura 12).

Diferentes polimorfismos no gene *BACH2* foram associados ao risco para DM1 em populações independentes. Por exemplo, o polimorfismo rs3757247 foi associado ao DM1 de início na infância e ao DM1 desencadeada por insulina no Japão (AYABE *et al.*, 2016; ONUMA *et al.*, 2019b). Além disso, os polimorfismos rs3757247 e rs11755527 em estreito desequilíbrio de ligação em caucasianos e o rs11755527 em paquistaneses foram associados ao DM1 (COOPER *et al.*, 2008; GRANT *et al.*, 2009; KIANI *et al.*, 2015). Em um tipo estudo caso-controle experimento multiétnico o polimorfismo rs11755527 foi associado à proteção da positividade do auto-anticorpo IA-2A.

Os polimorfismos genéticos em *BACH2* estão correlacionados a uma variedade de doenças autoimunes (YANG *et al.*, 2019), incluindo o DM1 (COOPER *et al.*, 2008; GRANT *et al.*, 2009; ONUMA *et al.*, 2019b). Dentre vários polimorfismos do gene *BACH2*, um dos que se destacam é o rs3757247, é uma variante localizada no intron 2, com a troca alélica de uma Guanina por uma

Adenina (G>A), o que leva a pequenas alterações no nível de expressão gênica, causando alterações significativas na função das células T reguladoras (Tregs), resultando em uma resposta imune mediada por células T à insulina (ONUMA *et al.*, 2019b).

FIGURA 12. LOCALIZAÇÃO DO GENE *BACH2* NO CROMOSSOMO.



O gene *BACH2* possui 9 exons (rosa) e 8 introns (cinza). Em destaque a localização no intron do polimorfismo do estudo, rs3757247.

Fonte: Adaptado de IGARASHI, KUROSAKI e ROYCHOUDHURI, 2017.

Marroqui e colaboradores (2014) demonstraram que havia uma expressão semelhante de *BACH2* em células de ilhotas e células imunes e locais de ligação do fator de transcrição *BACH2* eram onipresentes em mRNA das ilhotas humanas tratadas com citocinas. Além disso, o silenciamento de *BACH2* e a exposição a citocinas pró-inflamatórias aumentou a fosforilação da proteína pró-apoptótica JNK1 pela regulação positiva da proteína quinase 7 ativada por mitogênio (MKK7) e regulação negativa de PTPN2. JNK1 aumenta a fosforilação da proteína pró-apoptótica BIM, e o *knockdown* de JNK1 e BIM protege as células β da apoptose induzida por citocinas em células com *BACH2* silenciado (SANTIN *et al.*, 2011; MARROQUI *et al.*, 2014). Portanto, acredita-se que Bach2 regula a apoptose das células β induzida por citocinas pró-inflamatórias regulando a via JNK1/BIM, enquanto a superexpressão de *BACH2* tem um efeito protetor (MARROQUI *et al.*, 2014). Em conclusão, muitos experimentos confirmaram que o Bach2 está associado ao risco genético do DM1.

2.3.3 Matrix Metalloproteinase 9

A matriz extracelular (MEC) não só desempenha um papel de suporte para órgãos e tecidos, mas também participa ativamente de outras funções, como regulação do ciclo celular e motilidade celular, sobrevivência e apoptose, bem como a distribuição de fatores de crescimento e integração de sinais nas células. A MEC é feita de centenas de moléculas, incluindo proteoglicanos; glicosaminoglicanos; proteínas estruturais, como colágeno e elastina; proteínas de adesão, como fibronectina e laminina; e proteases chamadas metaloproteases de matriz (MMPs) (CUI; HU; KHALIL, 2017). As MMPs pertencem a uma família de endopeptidases que contém 23 membros. As MMPs contêm zinco, são dependentes de cálcio e podem degradar e remodelar as proteínas que formam a ME. Elas também participam de diferentes processos biológicos e fisiológicos que são regulados por hormônios, fatores de crescimento e citocinas (KAPOOR *et al.*, 2016). Com base em sua distribuição sub-celular e especificidade para os componentes da ME, as MMPs são divididos em matriz metaloproteinas tipo membrana (MT-MMP-1, -3, -4), collagenases (MMP1, MMP-8, MMP-13, and MMP-18), gelatinases (MMP2 e MMP9), estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11) e matrilisinas (MMP-7 e MMP-26) (PEETERS *et al.*, 2015). A MMP9 é também conhecida como gelatinase B ou collagenase tipo IV, é um dos membros mais importantes das MMPs e contribui para degradação exacerbada da MEC (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993).

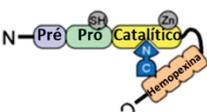
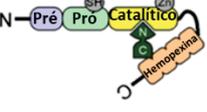
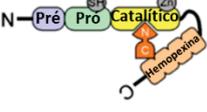
As MMPs desempenham um papel importante na remodelação do tecido durante vários processos fisiológicos, como embriogênese, morfogênese, angiogênese e reparo de feridas. Durante os processos biológicos normais, como gravidez e cicatrização de feridas, ocorrem alterações na expressão e atividade de MMP (CUI; HU; KHALIL, 2017). As MMPs e os TIMPs são de grande importância na morfogênese dos órgãos fetais e eventos subsequentes, tendo papéis como o aumento da atividade de morfogênese cardíaca (CUI; HU; KHALIL, 2017) e diferenciação pulmonar, bem como eventos necessária para o culminar da gravidez e do parto (KAPOOR *et al.*, 2016).

Metaloproteinas e TIMPs são normalmente expressos em vários tecidos. No entanto, tem sido descrito que durante o desenvolvimento de diferentes doenças humanas, as metaloproteinas 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13 e 14 são superexpressas em tecidos específicos. Esses tecidos incluem os rins, fígado,

cólon, placenta, intestinos, estômago, bexiga, pâncreas, ovário, útero e medula óssea, entre outros. De forma interessante, a MMP-9 passa a ser expressa em condições patológicas em tecidos em que não é normalmente expressa, como sistema circulatório, coração, sistema cardiovascular e pâncreas (CABRAL-PACHECO *et al.*, 2020).

Em condições fisiológicas normais, a atividade das MMPs é precisamente regulada de quatro formas: transcrição, ativação de precursores de zimogênio, interação com componentes específicos da MEC e inibição por TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinases), o principal deles (GALIS; KHATRI, 2002). A MMP-9, como outras MMPs, é produzida como pré-pró-enzima (WANG, W. *et al.*, 2002; TOTH, M. *et al.*, 2003), com peptídeo de sinal amino-terminal (97 kDa) que é clivado durante a tradução, resultando na pró-MMP-9 (92 kDa). Para manter as pró-MMPs inativas, o aminoácido cisteína do motivo interruptor de cisteína (PRCGXPD) localizado no domínio catalítico se coordena com os íons divalentes. A proteólise enzimática do pró-domínio é um interessante mecanismo de ativação da MMP-9 (86 kDa) (RAMOS-DESIMONE *et al.*, 1999; VANDOOREN *et al.*, 2017). Os ativadores MMP-9 são MMP-2, -3, -7, -10, 13, catepsina G e plasmina (AIMES; QUIGLEY, 1995) Curiosamente, MMP-3 é o ativador mais potente da MMP-9 (CHRISTENSEN; SHASTRI, 2015). Foi mostrado que a trombospondina-1 também aumenta a ativação da MMP-9 (EGEBLAD; WERB, 2002). A atividade das MMPs é inibida por TIMPs através de bloqueio reversível e as MMPs são expressas em tecidos específicos.

FIGURA 13. LOCALIZAÇÃO E INTERAÇÕES ENTRE INIBIDORES DE TECIDO DE METALOPROTEASES DE MATRIZ (TIMPS) E METALOPROTEASES DE MATRIZ (MMPs)

	LOCALIZAÇÃO	INIBIÇÃO	LIGAÇÃO
TIMP-1	 <p>Solúvel e superfície celular</p>	 <p>MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9,</p>	 <p>Pró-MMP9</p>
TIMP-2	 <p>Solúvel e superfície celular</p>	 <p>MMP2, MMP9, MMP14, MT1-MMP</p>	 <p>Pró-MMP2</p>
TIMP-3	 <p>Matrix extracelular e superfície celular</p>	 <p>MMP2, MMP9,</p>	 <p>Pró-MMP2, Pró-MMP9</p>

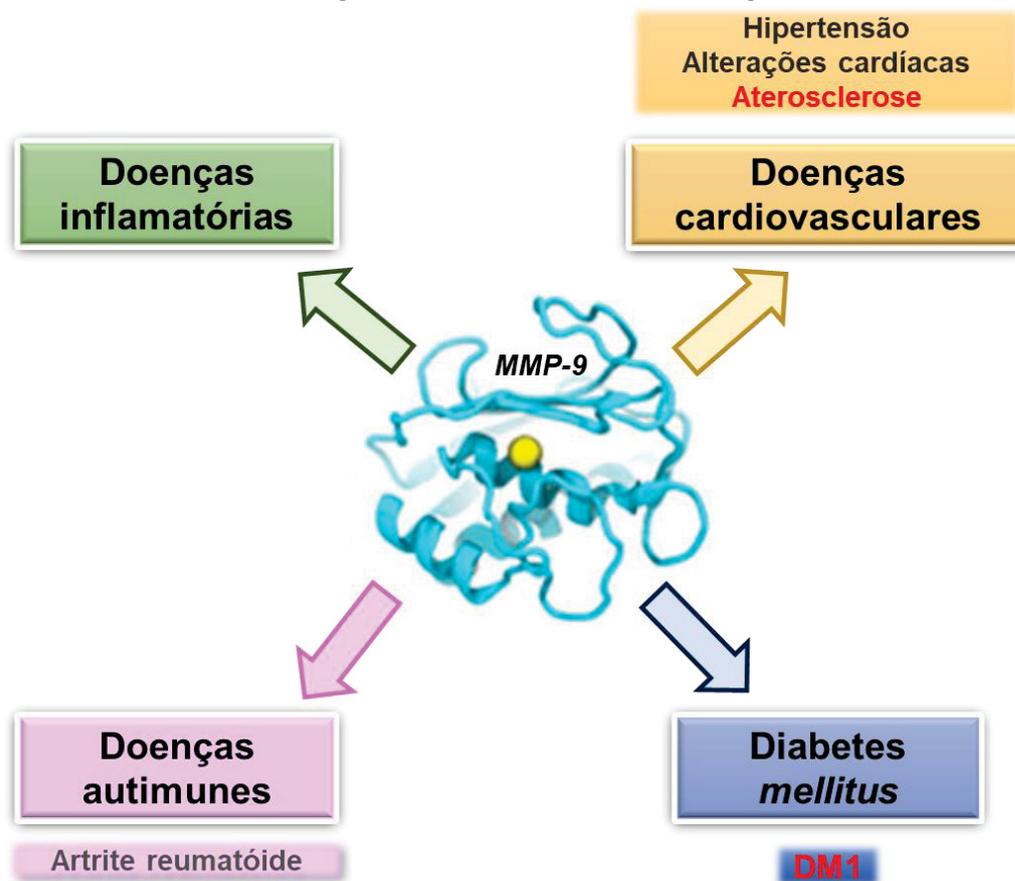
Todos os TIMPs são secretados, mas apenas o TIMP-3 é incorporado à matriz. Estruturalmente, os TIMPs são compostos por dois domínios empacotados lado a lado (domínios N-terminal e C-terminal). O domínio N-terminal algumas vezes é referido como o “domínio inibitório”. TIMP-1 inibe MMP-1–3 e MMP-7–9; TIMP-2 inibe MMP-2, MMP-9, MMP-14 e matriz metaloproteínas tipo membrana 1 (MT1-MMP); TIMP-3 inibe MMP-2 e MMP-9. Além disso, os TIMPs interagem com as pró-formas das MMPs de forma não inibitória, e eles também têm funções independentes da inibição das MMPs, por ligação a receptores de superfície celular (TIMP-1 para CD63; TIMP-2 para $\alpha\beta 1$ integrina e LRP1; TIMP-3 para EFEMP1, VEGFR2 e AGTR1,2).

Fonte: Adaptado de Cabral-Pacheco e colaboradores (2020)

Os papéis da MMP9 e TIMPs na manutenção da saúde e da doença ganharam interesse. Tem um espectro diversificado de atividade: 1) degrada proteínas de junção apertada e todos os componentes proteicos da matriz extracelular, incluindo laminina, colágeno e fibronectina (FENG *et al.*, 2011); 2) facilita a migração e invasão dos leucócitos (LAVINI-RAMOS *et al.*, 2017); ;3) integração de vias imunorregulatórias (LAVINI-RAMOS *et al.*, 2017); 4) manutenção das barreiras teciduais pelo processamento de uma variedade de proteínas não que não componentes da matriz, incluindo citocinas e quimiocinas (VAN LINT; LIBERT, 2007; NISSINEN; KAHARI, 2014); e 5) adaptação plasmática e tecidual em condições metastáticas (WIECZOREK *et al.*, 2015). Para entender como a regulação dessas moléculas desempenha um papel nas condições patológicas e como essas moléculas intervêm na secreção de fatores de crescimento, espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas poderia ser usado para ajudar a identificar ferramentas para um melhor manejo da doença.

Regulação anormal das MMP9 e TIMPs tem um papel relevante em condições patológicas, incluindo inflamação, diabetes mellitus, nefropatia diabética, doença cardiovascular, hipertensão, aterosclerose, enfraquecimento da matriz, ativação microglial, doenças autoimunes, e carcinogênese (AMALINEI *et al.*, 2010) (Figura 14). Eles também estão envolvidos na patogênese de complicações agudas, como síndromes coronárias agudas (SUZUKI, M. *et al.*, 2006).

FIGURA 14. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS DOENÇAS ASSOCIADAS A MMP-9



MMPs e TIMPs são frequentemente regulados como um meio de controlar o excesso de atividade das MMP no DM (Figura 14). Em pacientes com DM, a hiperglicemia constante gera estresse oxidativo (EO). A síntese de MMP-9 é induzida pela hiperglicemia sustentada. Isso foi demonstrado a nível de proteína, como de expressão e a atividade da MMP-9 aumenta como consequência do estresse oxidativo gerado nas células endoteliais vasculares (UEMURA *et al.*, 2001). O TIMP-1 pode mitigar a morte de células β no DM1, porque aumenta a replicação das células β das ilhotas pancreáticas. Assim, o gene *TIMP-1* pode ser um alvo potencial na prevenção, ou mesmo a reversão, do DM1 (JIANG *et*

al., 2007). No entanto, TIMP-1 também foi associado com inflamação crônica de baixo grau no tecido adiposo de pacientes com DM2 (ZHANG, H.; SONG; HE, 2018). Há evidências crescentes das funções da MMP-9 no DM e distúrbios metabólicos. A concentração e atividade de MMP-9 estão aumentadas na urina de pacientes com DM1 e DM2, especialmente em pacientes com albuminúria e lesão renal estabelecida (GARCIA-FERNANDEZ *et al.*, 2020). MMP-9 medeia neuropatia retinal induzida por diabetes e vasculopatia (OPDENAKKER; ABU EL-ASRAR, 2019) e está associada à gravidade da retinopatia diabética (JAYASHREE *et al.*, 2018). MMP-9 é um bom marcador de macroangiopatia. Em modelos *ex vivo*, a nível de proteína, MMP-9 tem mostrado atividade em células endoteliais e regulação por altas concentrações de glicose (LORENZL *et al.*, 2002). Também foi relatado que a MMP-9 desempenha um papel no desenvolvimento da aterosclerose, e MMP-9 e MMP-2, juntamente com fatores de crescimento e citocinas, desempenham papéis no desenvolvimento de proteinúria, fibrose tubulointersticial e progressão da doença renal (DIMAS; ILIADIS; GREKAS, 2013).

As MMPs estão envolvidas no desenvolvimento e progressão da aterosclerose e outras DCVs (Figura 14); portanto, sua alteração está relacionada a maiores riscos de morbidade e mortalidade cardiovascular (HOPPS; CAIMI, 2015). Nas DCVs, alterações na degradação e regeneração da MEC ocorrem devido à instabilidade da parede vascular secundária ao dano observado neste tipo de doença (HOPPS; CAIMI, 2015). MMPs têm a capacidade de interagir com diferentes proteínas intracelularmente. MMP-9 está relacionada a patologias cardiovasculares, como formação de aneurisma (LONGO *et al.*, 2002), doença arterial coronariana, infarto do miocárdio (MI) (FERRONI *et al.*, 2003), aterosclerose (LOPES *et al.*, 2013), hipertensão arterial (GOH *et al.*, 2017) e insuficiência cardíaca (HALADE; JIN; LINDSEY, 2013) através da degradação de elastina e colágeno, remodelamento miocárdial e ruptura da placa aterosclerótica. A atividade da MMP-9 leva ao desenvolvimento de hipertensão em um estágio inicial, gerando degradação do colágeno e debilitação arterial (GOH *et al.*, 2017). A ruptura de uma placa aterosclerótica está associada à atividade de MMP-9, que participa da formação e desestabilização dessas placas ateroscleróticas que são formadas por colágenos tipos I, III, IV, V, XI e XVI (LOPES *et al.*, 2013). Nas placas

ateroscleróticas, os macrófagos são a principal fonte de MMP-9. A concentração de MMP-9 também está diretamente correlacionada com a atividade de PCR, fibrinogênio e IL-6, que são fatores que funcionam como marcadores para prever o risco de IM (FERRONI *et al.*, 2003). A fibrina é encontrada no glomérulo como substrato para MMP-9 e fornece um efeito protetor através do equilíbrio da degradação da fibrina e prevenção do seu acúmulo no glomérulo (LELONGT *et al.*, 2001). Além disso, a inibição da deposição de fibrina pela MMP-9 desempenha um papel na redução do tamanho do trombo e pode estar associada a uma diminuição na progressão da aterosclerose (YABLUCHANSKIY *et al.*, 2013). O ambiente do IM é caracterizado por células inflamatórias (principalmente neutrófilos), mediadores inflamatórios, e MMP-9, que está relacionada à fisiopatologia da remodelação ventricular pós-IM e insuficiência cardíaca congestiva (HALADE; JIN; LINDSEY, 2013). Elevadas concentrações de MMP-9 e MMP-2 são responsáveis pela formação e tamanho de aneurismas, visto que contribuem para a degradação da elastina (DALE *et al.*, 2015). Expressão diferencial, com MMP-9 aumentada e TIMP-1 e TIMP-2 reduzidos, ocorre nas formas mais comuns de aneurismas de aorta torácica (RABKIN, 2014).

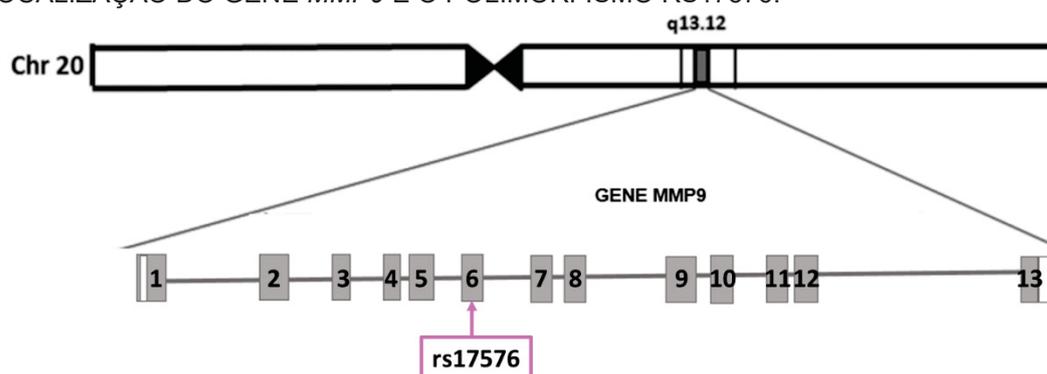
As MMPs extracelulares estão fortemente ligadas ao desenvolvimento e regulação da inflamação fisiológica e patológica por meio da regulação proteolítica das citocinas inflamatórias e quimiocinas (MANICONE; MCGUIRE, 2008). No entanto, estudos têm destacado o papel das MMPs intracelulares na mediação tanto de processos anti-inflamatória como pró-inflamatória (MONDAL *et al.*, 2020). MMP-9 está localizada no citosol de leucócitos, astrócitos e macrófagos (SANS-FONS *et al.*, 2010; SBAI *et al.*, 2010; ZHANG, Z. *et al.*, 2015). MMP-9 foi associada a doenças inflamatórias agudas e crônicas (Figura 14) (VANDOOREN *et al.*, 2017). MMP-9 permite o influxo de leucócitos na inflamação e afeta permeabilidade da barreira hematoencefálica, promovendo assim a inflamação (MONDAL *et al.*, 2020).

A atividade das MMPs é agora bem valorizado por seu papel no controle das respostas imunológicas (KHOKHA; MURTHY; WEISS, 2013) (Figura 14). Eficiente migração de neutrófilos ao longo de gradientes quimiotáticos e extravasamento através dos vasos sanguíneos e tecidos para locais de uma infecção é importante para estabelecer uma imunidade eficaz, e as MMPs

contribuem com essas funções por meio da modificação de agentes quimiotáticos. No local da infecção, os neutrófilos liberam MMP9 em seus grânulos de gelatinase, e MMP9 é então, capaz de clivar e ativar a interleucina-8 (IL-8) (PUGIN *et al.*, 1999; VAN DEN STEEN *et al.*, 2000). Como parte de um ciclo de feedback positivo, IL-8 ativada pode melhorar quimiotaxia de neutrófilos para o local da infecção (VAN DEN STEEN *et al.*, 2000). MMP9 melhora quimiotaxia dos macrófagos para o local de infecção (KIM, Y. H.; KWON; KIM, 2012) e em sinergismo com MMP2 promove infiltração de neutrófilos (SONG, J. *et al.*, 2013).

O gene *MMP9*, codificador da gelatinase MMP9, está localizado no cromossomo 20q12.2-13.1, consiste em 7.654 bases, e está organizado em 13 exons (HUHTALA *et al.*, 1991) (FIGURA 15).

FIGURA 15 ESQUEMA REPRESENTATIVO DO CROMOSSOMO HUMANO 20 E A LOCALIZAÇÃO DO GENE *MMP9* E O POLIMORFISMO RS17576.



Fonte: Adaptado de Verma e colaboradores (2015).

O polimorfismo rs17576 está localizado no exon 6 do gene *MMP9*, e a substituição da citosina (C) por uma timina (T) causa a troca da glutamina por arginina, resultando em alteração na conformação tridimensional e atividade da MMP-9. Esta variação *missense* causa mudança no domínio catalítico e domínio do tipo pexina da enzima MMP-9, levando à mudança de polaridade e funcionalidade, o que pode, assim, contribuir para o aumento do processo inflamatório (NAGASE; WOESSNER, 1999).

No DM, alterações marcantes na síntese e estrutura da matriz extracelular já foram relatados (SARAVANI *et al.*, 2017), ficando demonstrado que as concentrações de colágeno IV estão associados à hiperglicemia e resistência à insulina (MUONA *et al.*, 1993).

O DM1 causa muitas complicações macro e microvasculares (YURUK YILDIRIM *et al.*, 2019), devido ao processo inflamatório constante favorecido pela hiperglicemia, o que afeta o processo cicatricial, resultando no desequilíbrio entre os fatores de crescimento e as enzimas degradantes da matriz (SINGH *et al.*, 2013). Em pacientes com DM, a hiperglicemia constante gera estresse oxidativo e a síntese de MMP-9 é induzida nesse ambiente (CABRAL-PACHECO *et al.*, 2020). Uemura e colaboradores (2001), demonstraram que a concentração da proteína, bem como sua expressão e atividade aumentaram como consequência do estresse oxidativo.

Desse modo, é possível afirmar que os indivíduos quando expostos a condições ambientais ou epigenéticas podem ter a expressão de *MMP-9* alterada (OPSTAD *et al.*, 2014), pois concentrações elevadas de *MMP-9* em pacientes pediátricos com DM1 já foram descritos (GHARAGOZLIAN *et al.*, 2009; SYMEONIDIS *et al.*, 2013). Portanto, *MMP-9* pode ser um biomarcador importantes para avaliar o diabetes e doenças associadas.

2.3.4 Apolipoproteínas

Os lipídeos constituem a principal fonte de energia que é transportada entre diferentes órgãos. Como são insolúveis em água seu transporte no sangue é na forma de lipoproteínas. Lipoproteínas são complexos formados por gordura e proteínas específicas (apolipoproteínas). Cada partícula consiste de um núcleo hidrofóbico principalmente triacilgliceróis e colesterol esterificado, envolto por um escudo de moléculas anfipáticas, fosfolipídios, colesterol não esterificado e apolipoproteínas (RIFAI, 1986). A definição tradicional das classes de lipoproteínas é baseada em sua densidade ou, alternativamente, sua mobilidade eletroforética. Quando classificadas de acordo com o aumento da densidade são divididas em Quilomícrons (Q), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (REMALEY; DAYSPRING; WARNICK, 2018). Embora as lipoproteínas sejam divididas em diferentes classes não são populações distintas. Todas as lipoproteínas são partes do mesmo sistema em constante troca de conteúdo e são formadas ou degradadas em diferentes taxas (Figura 16).

As apolipoproteínas são os componentes proteicos das lipoproteínas, e suas características físicas e funções principais são resumidas na Tabela 1. As principais apolipoproteínas são das subclasses A, B, C, D ou E. Todas têm diferentes funções metabólicas (GANGABADAGE *et al.*, 2008). Cada classe de lipoproteína tem uma variedade de apolipoproteínas em proporções diferentes, com exceção do LDL, que contém principalmente apo B-100. Apo A-I é a proteína principal em HDL. Apo C-I, C-II, C-III e E estão presentes em várias proporções em todas as lipoproteínas. Apolipoproteínas coletivamente, têm três funções fisiológicas principais: ativar enzimas importantes nas vias metabólicas da lipoproteína, manter a integridade estrutural da lipoproteína, e facilitar a captação de lipoproteína nas células através do seu reconhecimento por receptores específicos de superfície celular (MAHLEY *et al.*, 1984). Além dessas apolipoproteínas principais, as lipoproteínas têm sido que se ligam fracamente a um grande número de outras proteínas plasmáticas, mas sua relevância para o

TABELA 1 CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DAS PRINCIPAIS APOLIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Apo	MM Da	Localização cromossomo	Função	Lipoproteína carreadora	Concentração	Expressão
Apo A-I	29.016	11	Cofator LCAT	Q, HDL	1-2 g/L 30-70 µM	Fígado, intestino
Apo A-II	17.414	1	Desconhecida	HDL	300-400 mg/L 30-60 µM	Fígado
Apo A-IV	44.465	11	Ativar LCAT	Q, HDL	3-6 µM	Intestino
Apo B-100	512.723	2	Secreção de TG do fígado Proteína de ligação do receptor LDL	VLDL, IDL, LDL	0,5-1,2 g/L	Fígado
Apo B-48	240.800	2	Secreção de TG do intestino Captação Qr no fígado	Q	~3 mg/L ¹	Intestino
Apo C-I	6.630	19	Ativa LCAT Inibe CEPT Inibe captação de lipoproteínas pelos receptores hepáticos	Q, VLDL, HDL	~60 mg/L 6-12 µM	Fígado
Apo C-II	8.900	19	Cofator da LPL	Q, VLDL, HDL	~40 mg/L 2-7 µM	Fígado
Apo C-III	8.800	11	Inibe LPL Inibe endocitose mediada por LDLr	Q, VLDL, IDL, LDL, HDL	~120 mg/L 6-20 µM	Fígado Intestino
Apo D	19.303 ²	3 ²	Desconhecida	HDL	~120 mg/L 2-10 µM	Adrenal, rins, pâncreas, baço, placenta, cérebro, pulmões, gônadas, nervos periféricos, LCR

Apo E	34.145	19	Facilita captação do Qr e IDL	Q, IDL, VLDL, LDL, HDL	30-70 mg/L	Fígado
Apo(a)	187.000-662.000	6	Desconhecida	Lp(a)	~40 mg/L ³	Fígado
ApoM	26.000	6	Formation of pre-β-HDL Transporte reverso do colesterol	LDL, VLDL, HDL	~23 mg/L ⁴ ~0.9 Mm ⁴	Fígado, rins

Abreviações: Apo: Apolipoproteína; MM: massa molecular; Q: quilomícron; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; IDL: lipoproteína de densidade intermediária; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; TG: triacilglicerol; LCAT: lecitina-colesterol aciltransferase; CEPT: proteína de transferência de ésteres de colesterol; LPL: lipase lipoproteica; LDLr: receptores LDL; LCR: fluído cérebro espinal; Qr: quilomícron remanescentes; Lp(a): lipoproteína a.

Fonte: Camato e colaboradores (1989); Pepin, O'Neil and Hoff (1991)³; Weech e colaboradores (WEECH *et al.*, 1991) Rassart e colaboradores (RASSART *et al.*, 2000); Olofsson and Boren (2005); Axler, Ahnstrom and Dahlback (2007)⁴; Drouin-Chartier e colaboradores (2017)¹; Remaley, Dayspring and Warnick (2018); Cheng and Zheng, 2021 (2021); Sanchez and Ganfornina (2021)².

metabolismo das lipoproteínas não é totalmente compreendida neste momento (HEINECKE, 2009).

Os quilomícrons (Q) são grandes partículas ricas em triglicerídeos, formadas nas células da mucosa intestinal, e estão presentes apenas na circulação após a ingestão de alimentos (BEISIEGEL, 1998). Sua principal apolipoproteína é apolipoproteína B-48 (apoB-48). Os quilomícrons transportam gordura do intestino para os tecidos, onde são rapidamente metabolizados pela lipase de lipoproteína (LPL). Os quilomícrons remanescentes (Qr) são prontamente absorvidos pelo fígado pelo receptor de LDL (LDLr) e a proteína relacionada ao LDLr (LRP) (BEISIEGEL, 1995, 1998). VLDL, IDL e LDL transportam gordura endógena do fígado para outros tecidos, principalmente tecidos adiposos, coração e músculos (REMALEY; DAYSPRING; WARNICK, 2018). VLDL é formado no fígado com apolipoproteína B-100 (apoB-100) como a principal apolipoproteína. A apoB100 recentemente sintetizada interage com a proteína de transferência de triglicerídeos microsossomal (*triglyceride transfer protein* - MTP), que catalisa a transferência de lipídios para a apoB nascente, gerando uma partícula pré-VLDL que é posteriormente lipídada para VLDL2 e transferida para o aparelho de Golgi. Lá, VLDL2 pode ser secretada ou ainda adquirir TG, gerando a VLDL1, uma partícula maior, rica em TG, que é então secretada na veia hepática (OLOFSSON; BOREN, 2005; OLOFSSON; WIKLUND; BOREN, 2007). O tempo meia vida do VLDL, como aos dos quilomícrons, é muito curto. A maioria dos triglicerídeos são absorvidos pelos tecidos, e o conteúdo restante forma a partícula IDL que é rapidamente hidrolisada em LDL (BEISIEGEL, 1995, 1998). Na verdade, tempo meia vida da IDL é tão curto (minutos) que as concentrações plasmáticas são normalmente quase indetectáveis. LDL, em contraste com VLDL e IDL, tem um intervalo bastante longo (3-4 dias). LDL são pobres em triglicerídeos, partículas ricas em colesterol e contêm cerca de 70% da gordura presente na circulação (REMALEY; DAYSPRING; WARNICK, 2018). O LDL transporta o colesterol para os tecidos através da ligação aos receptores de LDL (BEISIEGEL, 1998). HDL é um grupo de partículas menores de lipoproteínas ricas em proteínas que contêm apolipoproteína A-I (apo A-I) e/ou apolipoproteína A-II (apo A-II). Cerca de 70% da proteína HDL total é apo A-I, e 20% é apo A-II (SCANU; EDELSTEIN, 2008). HDL são heterogêneos, compreendendo várias subpopulações de partículas que

variam em forma, tamanho, densidade e carga de superfície. Eles contêm cerca de 25% do colesterol presentes no plasma (REMALEY; DAYSPRING; WARNICK, 2018).¹ As partículas de HDL têm um *scavenger*, absorvendo componentes de superfície de outras classes de lipoproteínas, mas também são cruciais para o transporte do excesso de colesterol de tecidos periféricos de volta ao fígado, o transporte reverso do colesterol (VON ECKARDSTEIN; NOFER; ASSMANN, 2001; RYE; BARTER, 2004; VAN DER VELDE; GROEN, 2005; ZHANG, Y. *et al.*, 2005; CURTISS *et al.*, 2006). A maioria das partículas HDL são esféricas com migração eletroforética α , e são chamados de HDL2 (1,063 < d < 1,125 g/ml – partículas menos densas e grandes) ou HDL3 (1,125 < d < 1,21 g/ml – partículas densas e pequenas). HDL2 são maiores e contêm mais tipos de proteínas do que HDL3 (KUVIN; ALSHEIKH-ALI; KARAS, 2006). Há também pequenas subpopulações de partículas HDL com migração eletroforética γ contendo apenas apolipoproteína E (apo E) (VON ECKARDSTEIN; NOFER; ASSMANN, 2001; KRIMBOU; MARCIL; GENEST, 2006). HDL pode ser formado a partir do fígado, intestino ou de fragmentos de outras lipoproteínas (RYE; BARTER, 2004). Partículas de HDL recém-formadas são discoides e são frequentemente chamadas de HDL nascente ou pré- β -HDL. As partículas HDL discoidais consistem apenas dos constituintes da superfície dispostos como uma bicamada molecular de fosfolipídios e colesterol não esterificado circundado por um ou duas moléculas de apo A-I (KUNITAKE; LA SALA; KANE, 1985; LUND-KATZ *et al.*, 2003; RYE; BARTER, 2004). Com a ajuda de várias enzimas, partículas pré- β -HDL adquirem seus conteúdos de lipídios e tornando-se partículas HDL com forma esférica. As enzimas envolvidas nestas as reações incluem o transportador 1 de cassete de ligação de ATP A1 (*ATP-binding cassette A1* - ABCA1), transportador de cassete de ligação a ATP G1 (*ATP-binding cassette G1* - ABCG1), receptor *scavenger* classe B tipo I (*scavenger receptor type B1* - SR-B1), lecitina-colesterol aciltransferase (*lecithin:cholesterol acyltransferase* - LCAT) e proteína de transferência de ésteres de colesterol (*cholesterol ester transfer protein* - CETP) (Figura 16) (VON ECKARDSTEIN; NOFER; ASSMANN, 2001; RYE; BARTER, 2004; ZHANG, Y. *et al.*, 2005; CURTISS *et al.*, 2006; YOKOYAMA, 2006).

As várias vias do metabolismo das lipoproteínas são complexas e se cruzam em vários pontos. Eles incluem a via intestinal e a via hepática, que são

baseadas em se as lipoproteínas envolvidas nestas vias de transporte de lipídios são de origem dietética (exógena) ou hepática (endógena). Outras vias importantes são via o receptor intracelular de LDL e o colesterol mediado por HDL (transporte reverso do colesterol). A principal função da via intestinal tem sido descrita como a absorção de lipídios dietéticos e sua distribuição, particularmente triglicerídeos, aos tecidos periféricos e fígado. Esta via começa quando os quilomícrons (Q) nascentes são montados a partir de triglicerídeos e colesterol dietéticos nos enterócitos e armazenados em vesículas secretoras no complexo de Golgi. Os Q são liberados por exocitose em o espaço extracelular e entram na circulação por meio de dutos linfáticos. O conteúdo lipídico dos Q nascentes consiste principalmente em triglicerídeos (90% em massa) e apenas uma pequena quantidade de proteína, principalmente apo B-48 e as lipoproteínas A (2% em massa) (GOTTO; POWNALL; HAVEL, 1986). Logo após a secreção, estas partículas de lipoproteína adquirem rapidamente as apolipoproteínas C e apo E da HDL circulante. As apo CII na superfície dos Q promovem a lipólise de triglicerídeos por ativação da lipase lipoproteica (*lipoprotein lipase* - LPL), que está principalmente ligada à superfície luminal das células endoteliais. Os ácidos graxos liberados associados à albumina, gerados por lipólise, podem ser absorvidos pelas células musculares como fonte de energia ou pelas células adiposas para armazenamento. Simultaneamente, alguns dos fosfolipídios dos Q são transferidos de volta para HDL durante este processo. Os Q parcialmente lipolisados, chamados de quilomícrons remanescentes (Qr), são menores e contêm 10% a 20% menos triglicérides do que o Q nascente original. Devido a presença de apo B-48 e apo E em sua superfície, os Qr são reconhecidos por receptores remanescentes hepáticos específicos e são rapidamente internalizados dentro de horas por endocitose mediada por receptor e são posteriormente hidrolisados dentro dos lisossomos. O colesterol que entra nos hepatócitos pode ser usado na síntese de ácidos biliares, incorporado em lipoproteína recém-sintetizada, efluxado para partículas de apo A-I, secretados diretamente na bile, ou armazenados como éster de colesterol. Além disso, o colesterol proveniente da captação do Qr regula negativamente a 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase (*3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase* - HMG-CoA reductase), a enzima limitadora da taxa de biossíntese do colesterol. Com relação ao colesterol, a

grande maioria (85% a 90%) do colesterol que entra no lúmen intestinal é de fontes endógenas, não dietéticas (exógenas) (VAN DER VELDE; BRUFAU; GROEN, 2010). Grande quantidades de colesterol produzido endogenamente entram no lúmen intestinal por via hepatobiliar; vias de secreção intestinal direta, denominadas efluxo transintestinal de colesterol (*transintestinal cholesterol efflux* - TICE); ou liberação de colesterol pela membrana de enterócitos (VAN DER VELDE; BRUFAU; GROEN, 2010). Depois da absorção, o colesterol é usado na formação de Q ou na formação de HDL nascente por um processo dependente do transportador ABCA1. Complicando ainda mais o problema sobre a fonte do colesterol é aquele absorvido intestinalmente, ácidos graxos exógenos de origem exógena, que são os primeiros incorporados ao enterócito como TG nos Q, imediatamente após entrarem na circulação começam a trocar TG por éster de colesterol com outras lipoproteínas através da proteína de transferência de éster de colesterol (CEPT). Desta forma, as lipoproteínas produzidas endogenamente produzidas pelo fígado (VLDL, IDL, LDL e HDL) rapidamente adquirem e trafegam lipídios exógenos também.

A via hepática está envolvida com a entrega de lipídios que são empacotados no fígado para células periféricas. Conforme discutido anteriormente, no entanto, os Q também entregam colesterol produzido endogenamente, e muito do transporte de lipoproteínas de lipídeos não é apenas para células periféricas, mas também de volta ao intestino ou fígado. Quando o colesterol da dieta adquirido a partir da captação de Q mediada por receptor remanescentes é insuficiente, os hepatócitos também podem sintetizar seu próprio colesterol, aumentando a atividade da enzima HMG-CoA redutase ou adquirir colesterol via internalização das partículas LDL ou através da delipidação de partículas HDL quando estas interagem com o receptor *scavenger* classe B tipo I (*scavenger receptor class B type I* - SR-BI). Triglicerídeos produzidos endogenamente e colesterol adquirido ou sintetizado são empacotados junto com apo B-100 em partículas VLDL no retículo endoplasmático em uma etapa envolvendo a proteína de transferência microsomal. Uma perda total da função da proteína de transferência microsômica resulta na incapacidade de secretar lipoproteínas contendo apo B e é referido como abetalipoproteinemia. VLDL é uma partícula rica em triglicerídeos (55% em massa) que contém apo B-100 e quantidades variáveis

de apolipoproteínas apo E e C. O fígado também pode diretamente secretar uma pequena quantidade de IDL e LDL com ou sem apo E e C-III (SACKS, 2015). Apolipoproteínas C adicionais podem ser transferidas da HDL para VLDL após entrarem na circulação. Como no caso do metabolismo dos quilomícrons, apo C-II presente na superfície do VLDL ativa a LPL nas células endoteliais, que leva à hidrólise de triglicerídeos das VLDL e a liberação de ácidos graxos livres. Durante a lipólise, a partícula reduz de tamanho, e o excesso de fosfolípidios de superfície pode ser removido pela proteína de transferência de fosfolípidios e transferida para HDL. É importante notar, no entanto, que a taxa de hidrólise do triglicerídeo da VLDL é significativamente mais baixa do que do triglicerídeo quilomícron. Os quilomícrons muito maiores têm muitas mais cópias de apo C-II por partícula do que VLDLs, portanto aumentando sua ligação à LPL e aumentando sua depuração. O tempo médio de residência do triglicerídeo da VLDL é de 15 a 60 minutos, em comparação com apenas 5 a 10 minutos para os triglicerídeos do Q.

Durante o catabolismo lipolítico da VLDL, como fosfolípidios de superfície e o núcleo de triglicerídeo são hidrolisados e a proteína de transferência de éster de colesterol (*cholesteryl ester transfer protein* – CETP) medeia a troca de TG por colesterol esterificado com outras lipoproteínas, as VLDLs reduzem em tamanho permitindo que apoproteínas C e outras apolipoproteínas sejam transferidas para HDL, resultando VLDL remanescentes menores ricas em colesterol esterificado que podem ser absorvidas pelo fígado ou continuar sofrendo catabolismo lipolítico, sendo convertidas em partículas IDL menores e mais densas, que podem ser removidas por receptores remanescentes hepáticos que reconhecem apoE. Alternativamente, as VLDL remanescentes podem ser removidas da circulação após interação com o proteoglicanos hepáticos, e então, podem ser diretamente internalizados pelas células ou possivelmente transferidas para receptores remanescentes hepáticos para captação. Os VLDL e IDL remanescentes contribuem para o retorno do colesterol para o fígado em um processo denominado transporte reverso indireto do colesterol. Os destinos lipolíticos das VLDL e IDL são altamente dependentes de seu conteúdo de apo C-III e apo E (SACKS, 2015). À medida que VLDL e IDL são esgotadas de seus triglicerídeos essenciais, o excesso de componentes da superfície, como fosfolípidios, colesterol livre e apolipoproteínas, são

transferidos para HDL existente ou são usados na geração de partículas HDL de novo quando elas formam complexos com a apo A-I livre de lipídios.

As moléculas de colesterol esterificado também são transferidas da HDL para LDL pela CETP em troca de triglicerídeo e essa troca pode ser inibida pela proteína inibidora de transferência de lipídeo ou apolipoproteína F (MORTON; GREENE, 2011). Esta transferência de lipídios neutros para partículas de apo A-I para partículas apo B é denominado troca heterotípica em contraste com a troca homotípica que ocorre entre diferentes partículas de apo A-I ou entre diferentes partículas de apo B. O resultado líquido do acoplamento da lipólise acoplada com a reação de troca de colesterol esterificado é a substituição do núcleo de triglicerídeos da VLDL original por éster de colesterol. Nos humanos, cerca de metade da IDL é removido pelo fígado, e a outra metade sofre mais hidrólise, levando à geração de LDL. A maior parte do LDL e seu conteúdo de colesterol são eventualmente devolvidos ao fígado ou intestino pelo receptor LDL ou por depuração não mediada por receptor (SNIDERMAN; ZHANG; CIANFLONE, 2000; SNIDERMAN *et al.*, 2009), mas quando presentes em excesso, as partículas de LDL, independentemente do tamanho, infiltram na parede do vaso, onde se acumulam e podem causar aterosclerose.

O conceito tradicional da via de transporte reverso de colesterol (TRC) passou recentemente por um repensar radical e pode ser mais bem descrito como tráfego de colesterol mediado por HDL. Historicamente, acreditava-se que o TRC auxiliava o corpo manter a homeostase do colesterol removendo o excesso de colesterol das células periféricas e entregando-o ao fígado para excreção. Acreditava-se que era mediado principalmente pela HDL, portanto responsável por sua propriedade anti-aterogênica (EISENBERG, 1984). Evidências recentes mostram que esse caminho é muito mais complexo, um processo dinâmico envolvendo todas as outras lipoproteínas, incluindo LDL, o intestino e outros órgãos e reservatórios de colesterol. O TRC total é a soma das vias diretas e indiretas, que finalmente realocam ou livram o corpo de esteróis desnecessários (HELLERSTEIN; TURNER, 2014).

Esta via começa quando a apolipoproteína A-I pobre em lipídios (apo A-I) é secretada pelo fígado ou intestino delgado. Apo A-I adquire rapidamente fosfolipídios e colesterol das células pelo transportador 1 de cassete de ligação de ATP A1 (*ATP-binding cassette A1* - ABCA1) (EISENBERG, 1984). Acredita-

se que ABCA1 bombeie o excesso de colesterol e outros lipídios para a superfície externa da membrana plasmática, onde apo A-I, em um processo de extração semelhante a detergente, remove fosfolipídios e colesterol e forma HDL nascente. A forma de HDL produzida neste processo é discoidal e é denominada pré-HDL com base em sua migração eletroforética. Pré-HDL forma um disco fosfolipídico plano em uma configuração tipo bicamada porque é relativamente empobrecido em lipídios de núcleo neutro como triglicerídeos e ésteres de colesterol. Duas moléculas de apo A-I estabilizam a pré-HDL envolvendo os lados da bicamada fosfolipídica. Embora a maioria da HDL formada por este processo ocorra no fígado e no intestino, ABCA1 também está presente nas células periféricas e permite-lhes efluir o excesso de colesterol em HDL. Acredita-se que isso resulte na geração de uma espécie discoidal maior de HDL chamada alfa4-HDL. Porque a maioria do colesterol contida na HDL é de origem hepática, as partículas têm que estar realizando mais do que apenas TRC de volta ao fígado, então o conceito surgiu recentemente que as HDLs trafegam o colesterol em várias direções e ajudam o corpo a equilibrar o colesterol entre os vários reservatórios teciduais. Lipase hepática (LH) e receptor *scavenger* classe B tipo I (*scavenger receptor class B type I* - SR-BI) são considerados responsáveis pela regeneração das formas esféricas menores de HDL e pré-HDL, respectivamente, a partir da HDL madura para reiniciar este ciclo.

À medida que a HDL adquire colesterol, a lecitina-colesterol aciltransferase (*lecithin:cholesterol acyltransferase* - LCAT) esterifica o colesterol pela transferência de um ácido graxo insaturado da posição 2-Sn da fosfatidilcolina para a hidroxila do colesterol livre, gerando lisofosfolipídio (lisolecitina) e colesterol esterificado, muito mais hidrofóbico (ROUSSET *et al.*, 2011). O colesterol esterificado então se move para o núcleo da HDL, assim transformando-o de uma forma discoidal em uma forma esférica, que é a forma encontrada na HDL madura. A lisolecitina é removida da superfície das lipoproteínas ligando-se à albumina. As formas esféricas maiores de HDL, que às vezes são chamadas alpha1-3-HDL com base em sua migração eletroforética, também podem adquirir colesterol adicional por outros transportadores de membrana celular, como por transportador de cassete de ligação a ATP G1 (ATP-binding cassette G1 - ABCG1) e o transportador de membrana bidirecional de esterol (éster de colesterol), o receptor *scavenger* classe B tipo I (*scavenger*

receptor type B1 - SR-B1). À medida que amadurece, HDL também pode adquirir fosfolipídios de superfície da proteína de transferência de fosfolipídios e partículas menores de HDL podem fundir-se, criando espécies ainda maiores (ROSENSON *et al.*, 2012). As partículas grandes de HDL podem também adquirir colesterol não esterificado das células por meio de livre difusão (ROTHBLAT *et al.*, 2002) ou de outras lipoproteínas, das membranas de eritrócitos ou colesterol trafegado com albumina. Durante este processo, inúmeras proteínas séricas e outras frações lipídicas também podem se unir a vários subconjuntos de partículas HDL, podendo contribuir de alguma forma na sua função anti-aterogênica (TOTH, P. P. *et al.*, 2013).

Com relação à cardioproteção, a função provavelmente mais importante da HDL se relaciona ao colesterol é a delipidação de macrófagos carregados de esteróis da parede arterial chamados de células espumosas. Esse processo, denominado transporte reverso de colesterol de macrófagos, é realizado por ambos livre difusão e efluxo mediado por ABCA1, ABCG1 ou SR-B1 (ROTHBLAT *et al.*, 2002). Curiosamente, embora o quantidade de colesterol efluxada está relacionada ao benefício, o quantidade de colesterol removida neste processo é tão pequena que tem um efeito insignificante no reservatório de colesterol total da HDL, portanto limitando seu uso como um marcador desse processo (CUCHEL; RADER, 2006).

As HDLs circulantes ricas em colesterol, ricas em fosfolipídeos e pobres em triglicerídeos têm várias opções na distribuição de sua carga de lipídios. Éster de colesterol pode ser transferido para outras lipoproteínas em troca de triglicerídeos via CETP. Neste processo, as partículas de HDL podem transferir éster de colesterol para partículas contendo apo B em um processo denominado troca heterotípica ou para outras espécies de HDL em um processo denominado troca homotípica (CHARLES; KANE, 2012). Como as partículas contendo apo B são muito mais numerosas, grande parte da troca colesterol esterificado-triglicerídeos ocorre entre HDLs e LDLs. Potentes inibidores da CETP, não apenas aumentam drasticamente o HDL-C, mas também reduzem significativamente LDL-C, sugere que uma quantidade substancial de colesterol dentro de LDLs derivam das HDLs (NIESOR, 2011; DAVIDSON *et al.*, 2013). Modulação da troca mediada por CETP entre LDL e HDL pode ocorrer pela apolipoproteína F (MORTON; GREENE, 2011). Após receber éster de colesterol

da HDL, LDL e outras partículas contendo apo B podem trafegar para o fígado ou intestino em uma via chamada TRC indireto. Adicional opções para o tráfego de colesterol da HDL é a entrega direta por absorção mediada por SR-B1 para o fígado ou tecidos esteroideogênicos ou adipócitos, que servem como um órgão de armazenamento de colesterol. Partículas de HDL também podem participar de TRC direto por outros potenciais receptores localizados no fígado, como o holopartícula ou subunidade β da ATP sintase produzida pela mitocondrial (BOYER, 1997), ou por remoção mediada pelo receptor da apo E.

O fígado tem muitas opções para colesterol adquirido direta ou indiretamente: usá-lo em suas membranas celulares, convertê-los em ácidos biliares, incorpora na VLDL recém-formada, efluxá-lo para apo A-I, ou excretá-lo diretamente para o sistema biliar via transportador de cassete de ligação a ATP G5 e G8 (ABCG5, ABCG8). O intestino também pode promover a excreção de colesterol por uma nova via denominada efluxo transintestinal de colesterol (TICE) (VAN DER VELDE; BRUFAU; GROEN, 2010). O via exata pela qual o TICE promove a excreção de colesterol no intestino não é conhecido, mas acredita-se que envolva a transferência direta de colesterol da HDL ou lipoproteínas contendo apo B para o enterócito, que então excreta no lúmen intestinal.

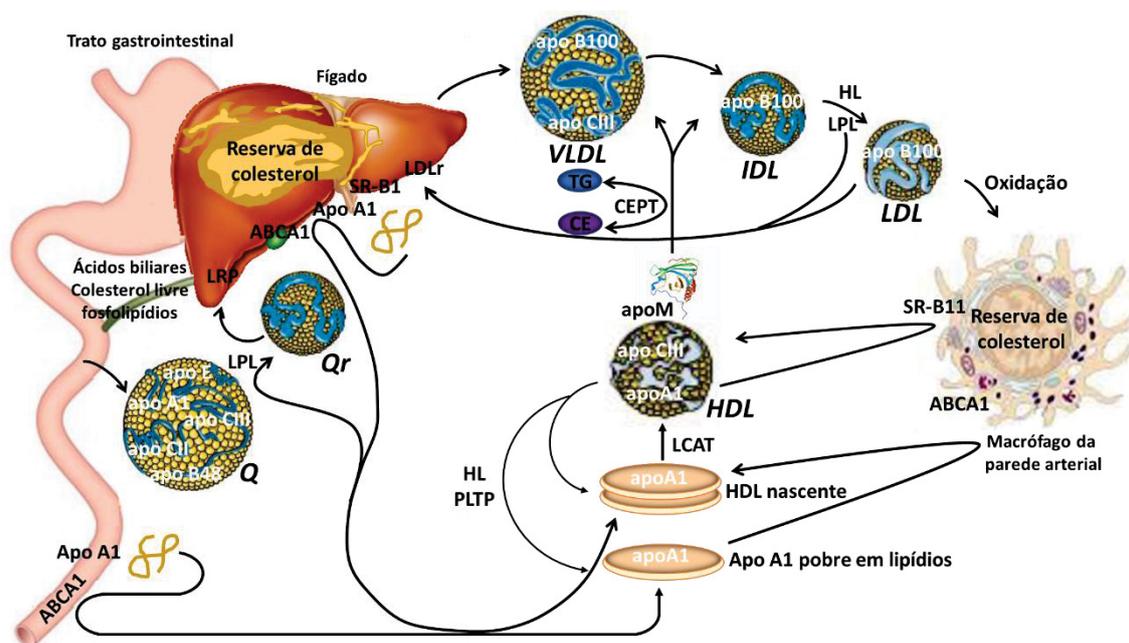
À medida que HDLs maduras adquirem triglicerídeos via troca pela CETP, estão sujeitas a aumento da lipólise pela lipase hepática e lipase endotelial. Neste processo, as HDLs maiores são convertidas em subespécies menores, que podem se romper liberando apo A-I, resultando no seu catabolismo renal pelo complexo megalina-cubilina (MOESTRUP; NIELSEN, 2005). Outras HDLs menores podem então reentrar no ciclo de lipidação. Embora LDL seja o principal produto da lipólise de VLDL, materiais de superfície de partículas ricas em triglicerídeos são transferidos para as pequenas HDL3 circulantes e subsequentemente esterificados pela LCAT para criar maiores HDL2 ricas em éster de colesterol. HDL2 contém o dobro de moléculas de colesterol por unidade de apolipoproteínas em relação a HDL3. HDL2 pode ser convertido de volta em HDL3 pela lipase hepática (ROSENSON *et al.*, 2011).

A apoC-III inibe LPL e a endocitose mediada pelos LDLr de partículas de lipoproteína (CLAVEY *et al.*, 1995; GANGABADAGE *et al.*, 2008). A depuração atenuada de lipoproteínas ricas em triglicerídeos estão associadas a aumento

risco coronariano e a indução de isquemia miocárdica (GINSBERG *et al.*, 1995; CHO, 2009).

A apoM está associada principalmente com a HDL, mas também está presente na LDL e lipoproteínas ricas em triglicerídeos (XU, N.; DAHLBACK, 1999; DAHLBACK; NIELSEN, 2006). A apoM pode afetar a conversão de partículas HDL por meio de LCAT (CHRISTOFFERSEN; JAUHAINEN; *et al.*, 2008). Foi confirmado que apoM permite que a pré-HDL seja transformada em partículas maduras de HDL, que estão envolvidas no efluxo de colesterol e podem ter efeitos anti-ateroscleróticos (WOLFRUM; POY; STOFFEL, 2005). No entanto, a descoberta de que apoM contendo LDL é mais resistente à oxidação e induz menos acúmulo de colesterol do que o LDL sem apoM (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2006) indica um importante papel funcional da apoM também no LDL. Outros estudos indicam que apoM está envolvida no metabolismo de lipoproteínas/lipídios, por exemplo, foi mostrado que a proporção de apoM em lipoproteínas ricas em triglicerídeos aumenta na fase pós-prandial (XU, N.; DAHLBACK, 1999), e a leptina, um regulador do metabolismo da lipoproteína secretado pelos adipócitos, inibe a expressão e secreção de apoM em linhagem hepática humana (HepG2) (LUO, G. *et al.*, 2005).

FIGURA 16. VISÃO GERAL ESQUEMÁTICA DO METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS E METABOLISMO REVERSO DO COLESTEROL.



Abreviações: ABCA1: transportador 1 de cassete de ligação de ATP A1; Q: quilomíron; CETP: proteína de transferência de ésteres de colesterol; LPL: lipase lipoproteica; Qr: quilomíron

remanescente; LRP: proteína relacionada ao receptor de LDL; SR-B1: receptor *scavenger* classe B tipo I; LDLr: receptor de LDL; HL: lipase hepática; PLTP: proteína de transferência de fosfolípidos; LCAT: lecitina-colesterol aciltransferase; CEPT: proteína de transferência de ésteres de colesterol; CE: colesterol esterificado; TG: triacilglicerol.

Fonte: Adaptado de Ahnstrom, (2009)

Tem havido uma série de estudos discutindo o que é mais importante para predição da DCV, o colesterol que as partículas de HDL e LDL carregam, ou a quantidade de partículas em si, medida como apoA-I e apoB (GOTTO *et al.*, 2000; FRANCIS; FROHLICH, 2001; WALLDIUS *et al.*, 2001; LUC *et al.*, 2002; PISCHON *et al.*, 2005; WALLDIUS; JUNGNER, 2006; AGGARWAL; KATHARIYA; VERMA, 2021). Vários estudos sugerem que apoA-I e apoB são melhores preditores de doença cardíaca coronária (DCC) e infarto agudo do miocárdio (IAM) do que as concentrações de lipoproteína (FRANCIS; FROHLICH, 2001; WALLDIUS *et al.*, 2001; LUC *et al.*, 2002; PISCHON *et al.*, 2005; WALLDIUS; JUNGNER, 2006). Em um estudo realizado com uma população dinamarquesa, com base no estudo CCHS (*Copenhagen City Heart study*), mostrou que apoA-I e apoB eram tão bons em prever o desenvolvimento de DCC como HDL e LDL (AHNSTROM *et al.*, 2008). Associações semelhantes foram observadas com apoC3 (OOI *et al.*, 2008; JENSEN *et al.*, 2018).

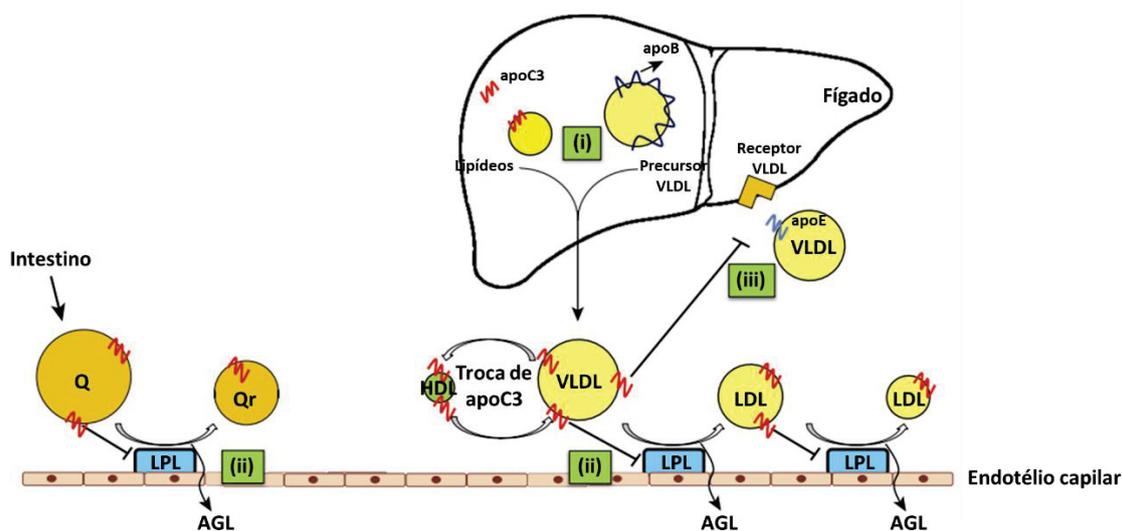
A incidência e prevalência do DM1 está aumentando globalmente e, apesar do gerenciamento moderno dos fatores de risco associados, permanece associada a um grande aumento da morbidade e mortalidade por DCV (LAING *et al.*, 2003; SCHWAB, K. O. *et al.*, 2006; BUSE *et al.*, 2007). Embora a dislipidemia aumente o risco da DCV (SCHWAB, K. O. *et al.*, 2006), pacientes com DM1 geralmente têm perfis lipídicos normais. Portanto, é fundamental para identificar os fatores associados ao desenvolvimento de DCV nesta forma de diabetes.

Vários estudos identificaram a utilidade clínica das concentrações séricas das apolipoproteínas e subclasses de lipoproteínas definidas pelas apolipoproteínas em predição das complicações vasculares no DM2 (ALAUPOVIC *et al.*, 1992; BLACKETT, P. R. *et al.*, 2005; LEY *et al.*, 2010; SASONGKO *et al.*, 2012; BASU *et al.*, 2018), complementando as associações conhecidas da DCV com lipídeos convencionais; no entanto, esses dados são limitados na população DM1.

2.3.4.1 Gene Apolipoproteína C3

A apolipoproteína C3 (apoC3) está associada com lipoproteínas ricas em triglicerídeos (*triglyceride-rich lipoproteins* - TRLs: VLDL, Q e suas lipoproteínas remanescentes), LDL e HDL. É importante ressaltar que apoC3 é trocada entre as lipoproteínas. Durante a lipólise das TRLs mediada pela lipase lipoproteica (LPL), apoC3 é transferida para HDL, em uma magnitude proporcional a que os ácidos graxos são liberados, e então a apoC3 é transferida de volta a recém-sintetizada VLDL (OOI *et al.*, 2008) (Figura 17). No entanto, apoC3 não é uniformemente distribuída entre as diferentes populações de HDL (SACKS EDITORIAL BOARD; ZHENG; COHN EDITORIAL BOARD, 2011).

FIGURA 17 METABOLISMO DA APOC3 E DAS LIPOPROTEÍNAS RICAS EM TRIGLICERÍDEOS (TRL).



Apoproteína C3 (ApoC3) está associada principalmente a quilomícrons (Q), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL), e, em menor grau, com lipoproteínas de baixa densidade LDL. A apoC3 influencia o metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (TRLs) por diferentes mecanismos: (i) favorece a montagem e produção de VLDL1 no fígado; (ii) inibe a atividade da lipoproteína lipoproteica (LPL); e (iii) interfere com a ligação de apoB ou apoE aos receptores hepáticos, resultando assim em um catabolismo retardado das TRLs remanescentes. Durante a hidrólise mediada pela LPL dos triglicerídeos (TG) das partículas de VLDL, apoC3 se move das partículas de VLDL para HDL, com uma transferência que é proporcional à magnitude da liberação de ácidos graxos livres (AGL).

Fonte: Adaptado de Norata e colaboradores (2015).

A hipertrigliceridemia (HTG) é caracterizada por altas concentrações plasmáticas de triglicerídeos (TG) e VLDL-TG e um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de apoC3, devido ao aumento da quantidade de apoC3 associada as lipoproteínas ricas em TG e seus remanescentes (CATAPANO, 1980; MARCOUX *et al.*, 2001; SACKS, 2015). Como

consequência, uma mudança no padrão na secreção das TRLs contendo apoE (que são rapidamente removidos da circulação e têm um baixa tendência à formação de LDL) para TRLs que não contêm apoE, mas têm um conteúdo de apoC3 mais alto é observada, resultando em retenção de lipoproteína mais longa e uma conversão rápida em LDL associada com uma depuração direta reduzida (MENDIVIL *et al.*, 2010; ZHENG, C. *et al.*, 2010; SACKS, 2015).

Inicialmente, foi proposto que apoC3 inibia a atividade da LPL; no entanto, embora altas concentrações de apoC3 inibe a atividade da LPL *in vitro*, a apoC3 presente em VLDL de indivíduos normais ou com hipertrigliceremia leve pode não ser suficiente para inibir a atividade da LPL (SACKS, 2015). De acordo com estes achados, camundongos transgênicos com superexpressão de apoC3 humana não exibem uma atividade LPL reduzida e seus VLDL enriquecidos com apoC3 são normalmente hidrolisados pela LPL *in vitro* (AALTO-SETALA *et al.*, 1992; DE SILVA *et al.*, 1994), mesmo na presença de uma diminuição da taxa catabólica fracionária de VLDL, em comparação com os animais de controle. Mas quando a *APOC3* humana é expressa em níveis muito elevados, uma depuração mais lenta de VLDL-TG é observada (EBARA *et al.*, 1997). Além disso, estudos cinéticos em humanos mostraram que apoC3 associada com TRLs correlaciona-se positivamente com a produção de VLDL-TG e negativamente com o catabolismo de VLDL (COHN *et al.*, 2004; CHAN *et al.*, 2006; TASKINEN *et al.*, 2011). Esses achados sugerem que a apoC3 favorece a hipertrigliceridemia por meio de diferentes mecanismos (TASKINEN *et al.*, 2011), conforme descrito a seguir.

Em primeiro lugar, apoC3 também interfere com a ligação de apoB ou apoE aos receptores hepáticos, resultando assim em um catabolismo retardado das TRLs remanescentes (Figura 17) (JONG; HOFKER; HAVEKES, 1999; OOI *et al.*, 2008). Em altas concentrações, apoC3 também inibe a lipase hepática, reduzindo ainda mais a lipólise. Assim, os indivíduos sem apoC3 têm baixas concentrações de TRLs devido a uma lipólise eficiente de TG (GINSBERG *et al.*, 1986) como também observado em camundongos com deleção genética de o gene *APOC3* (MAEDA *et al.*, 1994). No entanto, a superexpressão de apoC3 em camundongos resulta em HTG (ITO, Y. *et al.*, 1990). Além disso, as VLDL ricas em apoC3 são rapidamente catabolizadas para LDL, enquanto as TRLs com apoE, mas não com apoC3, são rapidamente eliminadas da circulação (ZHENG,

C. *et al.*, 2007). Aproximadamente 40% das TRLs secretados com apoC3 também contém apoE, mas todas as lipoproteínas contendo apoB que contém apoE também contém apoC3 (ZHENG, C. *et al.*, 2007).

Em segundo lugar, apoC3 inibe a atividade da LPL, um efeito que está relacionado à sua capacidade de prevenir que a LPL se ligue aos lipídeos, resultando na diminuição da atividade enzimática e aumento da suscetibilidade da LPL à inativação (LARSSON *et al.*, 2013).

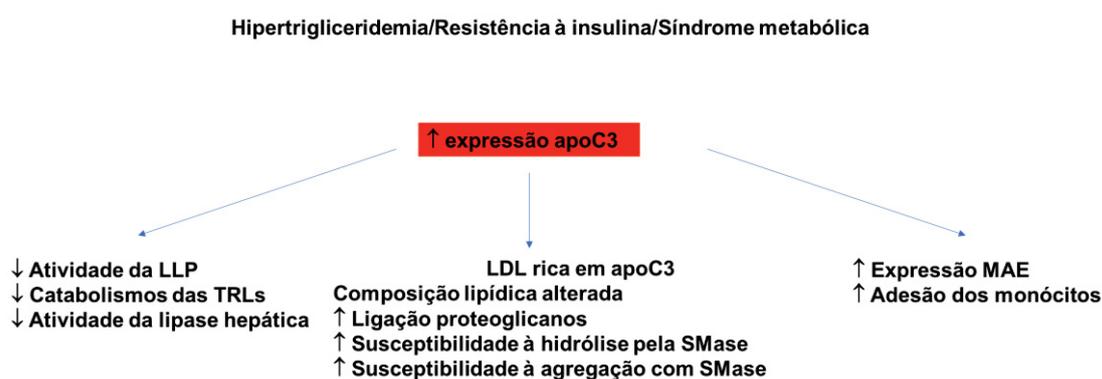
Terceiro, a apoC3 também afeta a montagem e secreção hepática da VLDL, principalmente pelo aumento da produção da VLDL1 rica em TG, enquanto que VLDL2 ou outras lipoproteínas contendo apoB não são afetadas (SUNDARAM *et al.*, 2010; YAO, Z., 2012) (Figura 17). Uma mutação de perda de função no domínio C-terminal de ligação a lipídeos, identificada em indivíduos com hipotrigliceridemia, aboliu o efeito estimulatório da apoC3 na montagem e secreção da VLDL rica em TG; este efeito foi devido à ligação prejudicada da apoC3 mutada com gotículas de lipídios luminais, os quais representam os TG precursores para a maturação da VLDL1, e resultou na secreção de apoC3 associada a HDL (QIN *et al.*, 2011). Da mesma forma, outra mutação *missense* na região terminal N da apoC3 que causa hipotrigliceridemia prejudica a capacidade da apoC3 de estimular a produção hepática de VLDL; este efeito foi devido ao acúmulo de apoC3 mutada nas frações lumenais de IDL/LDL que podem prevenir a fusão entre gotículas de lipídios e os precursores de VLDL (SUNDARAM *et al.*, 2010).

As concentrações de ApoC3 em VLDL e LDL também estão associados à progressão da aterosclerose e o risco de doença cardíaca coronariana (DCC) (LUC *et al.*, 1996; SACKS *et al.*, 2000) Além disso, LDL contendo apoC3 representa um fator de risco independente para eventos coronários em pacientes com DM2 que tiveram um enfarte do miocárdio (LEE *et al.*, 2003). Esses resultados foram confirmados por um estudo prospectivo de indivíduos inicialmente livre de CVD, mostrando que o LDL contendo apoC3 está fortemente associado à CVD (MENDIVIL *et al.*, 2010). Isso pode ser devido ao fato de a LDL que contém apoC3, embora represente apenas 10% das partículas de LDL, são maiores, têm um alto teor de colesterol e TG e exibem suscetibilidade à modificação aumentada (HIUKKA *et al.*, 2009).

Também foi demonstrado que indivíduos obesos têm uma maior prevalência de partículas de HDL contendo apoC3 em comparação com indivíduos magros, que têm uma maior prevalência de partículas HDL sem apoE ou apoC3 (TALAYERO *et al.*, 2014); e partículas HDL contendo apoC3 foram associadas com CVD (JENSEN *et al.*, 2012), sugerindo que indivíduos obesos têm partículas de HDL disfuncionais com menor capacidade de proteção, enquanto indivíduos com peso normal têm uma prevalência maior de partículas protetoras de HDL.

Além de seus efeitos no metabolismo das TRLs, outros efeitos pró-aterogênicos da apoC3 foram sugeridos (Figura 18). Como exemplo, em pacientes com HTG e DM2, LDL enriquecida com apoC3 exibiu uma composição lipídica alterada em comparação com LDL livre de apoC3, ligação aumentada a proteoglicanos e retenção de lipoproteínas e aumento da suscetibilidade de LDL à hidrólise e agregação por esfingomielinase (OLIN-LEWIS *et al.*, 2002; DAVIDSSON *et al.*, 2005; HIUKKA *et al.*, 2009) (Figura 18). Assim, o aumento da retenção de lipoproteína na íntima da parede arterial promove a modificação da lipoproteína e é um fator inflamatório resposta que representa as etapas iniciais da aterogênese (FOGELSTRAND; BOREN, 2012)

FIGURA 18. APOC3 E ATEROSCLEROSE.



ApoC3 em quilomícrons (Q) e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) inibem a atividade da lipase lipoproteica (LPL) e a atividade da lipase hepática, aumentando assim as concentrações das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (TRLs). Lipoproteína de baixa densidade (LDL) enriquecida com ApoC3 exibe aumento na ligação à proteoglicanos e aumento na suscetibilidade à atividade da esfingomielinase (SMase). ApoC3 induz a expressão da molécula de adesão em células endoteliais (MAE) e adesão de monócitos. Esses mecanismos contribuem para a função aterogênica da apoC3.

Fonte: Adaptado de Norata e colaboradores (2015).

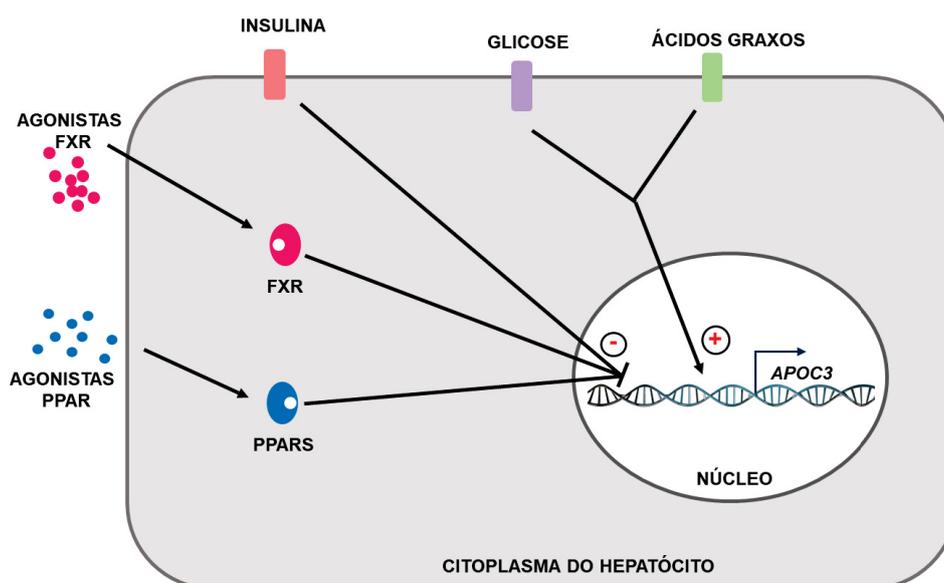
VLDL e LDL contendo apoC3 aumentaram a adesão de monócitos às células endoteliais em comparação com lipoproteínas sem apoC3 [69], e a exposição de células endoteliais a apoC3 ou VLDL enriquecido com apoC3 induziu a expressão da molécula 1 de adesão de célula vascular (VCAM-1) e molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) (Figura 18) (KAWAKAMI *et al.*, 2006).

HDL contendo apoC3 exibem menor atividade anti-inflamatória (KAWAKAMI *et al.*, 2006). Análise de proteômica de partículas de HDL isoladas de pacientes com doença arterial coronariana estável ou síndrome coronariana aguda mostrou que essas partículas são enriquecidas com apoC3 em comparação com as partículas de HDL isoladas de indivíduos saudáveis. HDL enriquecida com ApoC3 falham em induzir a expressão de proteínas anti-apoptóticas e estimula vias pró-apoptóticas em células endoteliais (RIWANTO *et al.*, 2013). Quando tratado com um anticorpo anti-apoC3, as propriedades anti-apoptóticas da HDL melhoraram significativamente, enquanto a adição de apoC3 à HDL de indivíduos saudáveis comprometeu a atividade anti-apoptótica (RIWANTO *et al.*, 2013), confirmando que o enriquecimento da HDL com apoC3 prejudica as funções de proteção da HDL. A sinalização molecular desses efeitos é pobremente compreendida. ApoC3 induz apoptose das células β através da ativação da proteína p38 quinase ativada por mitogênio (*mitogen-activated protein kinase* - MAPK) e quinase 1/2 regulada por sinal extracelular (*extracellular signal-regulated kinase 1/2* - ERK1/2) (SOL; SUNDSTEN; BERGSTEN, 2009) enquanto, nas células endoteliais, a ativação de fator nuclear kappa B (*factor nuclear kappa B* - NF-kB, mas não de MAPK, parece mediar a expressão da molécula de adesão induzida por apoC3 (ZHENG, C. *et al.*, 2013).

O gene que codifica a apolipoproteína C3 (*APOC3*), é membro de um grupo de genes *APOA1/C3/A4/A5*, localizados cromossomo 11q23, no mesmo *locus* 6 que o gene *APOA5*, uma região com forte ligação ao metabolismo lipídico (BOSSE *et al.*, 2004; AU *et al.*, 2017). O gene *APOC3* possui 3367 pares de base (pb) compreendendo 4 exons (VERRIJKEN *et al.*, 2013) (Figura 21) que codifica uma glicoproteína madura de 79 aminoácidos, sintetizada principalmente no fígado e em menor proporção pelo intestino delgado (WATERWORTH *et al.*, 2000; VERRIJKEN *et al.*, 2013).

A expressão de *APOC3* é regulada negativamente pela insulina, pela ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (*Peroxisome proliferator-activated receptor* - PPAR) e do receptor Farnesóide X (*Farnesoid X Receptor* - FXR) (CHEN, M. *et al.*, 1994; STAELS *et al.*, 1995; CLAUDEL *et al.*, 2003). Assim, conforme figura 6, em estado de resistência à insulina, a expressão e secreção de apoC3 pode estar desregulada. A glicose induz a expressão de apoC3 (CARON *et al.*, 2011), e o aumento do fluxo de ácidos graxos para o fígado e intestino, característico do estado de resistência à insulina, estimula a produção de TRLs e TRLs associadas a apoC3 (PAVLIC *et al.*, 2008) (Figura 18). A concentração de apoC3 também pode ser modulada pela dieta; por exemplo, uma dieta rica em gordura com baixo teor de ácidos graxos saturados mas enriquecido em ácidos graxos monoinsaturados e ômega-3 poliinsaturado reduzem significativamente apoC3 total e apoC3 em lipoproteínas contendo apoB em indivíduos com hiper trigliceridemia ou hiperlipidemia combinada, enquanto uma dieta rica em carboidratos com baixo teor de gordura é menos eficaz na correção do perfil lipídico aterogênico (PIEKE *et al.*, 2000).

FIGURA 19. MECANISMOS MOLECULARES NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA *APOC3*.



Agonistas do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) e do receptor X farnesóide (FXR) e insulina reduzem a expressão de *APOC3*, enquanto a glicose ou ácidos graxos induzem a expressão do gene *APOC3*.

Fonte: Adaptado de Norata e colaboradores (2015).

Em crianças com DM1 as concentrações plasmáticas de apoC3 encontram-se aumentadas (BLACKETT, P. *et al.*, 1988), quando comparadas aos indivíduos sem a doença. Estudos mostraram que as concentrações plasmáticas de apoC3 (BASU *et al.*, 2019; KANTER *et al.*, 2019) ou as concentrações de apoC3 associada à HDL (BASU *et al.*, 2019) foram associadas DAC em pacientes com DM1 com concentrações de triglicerídeos normais ou próximas da normalidade.

É importante ressaltar que a inibição de *APOC3* por um oligonucleotídeo antisense reduziu as concentrações plasmáticas de triglicerídeos e evitou a aterosclerose em um modelo de camundongo de DM1 (KANTER *et al.*, 2019). O terapêutico antisense *APOC3* (volanesorsena) também demonstrou reduzir as concentrações plasmáticas de triglicerídeos em coortes humanas (GAUDET *et al.*, 2015; WARDEN; DUELL, 2018). Esses estudos apontam para apoC3 como um importante fator de risco de DCV e mediador no DM1. A razão pela qual apoC3 prediz o risco de DCV em indivíduos com DM1 é desconhecida.

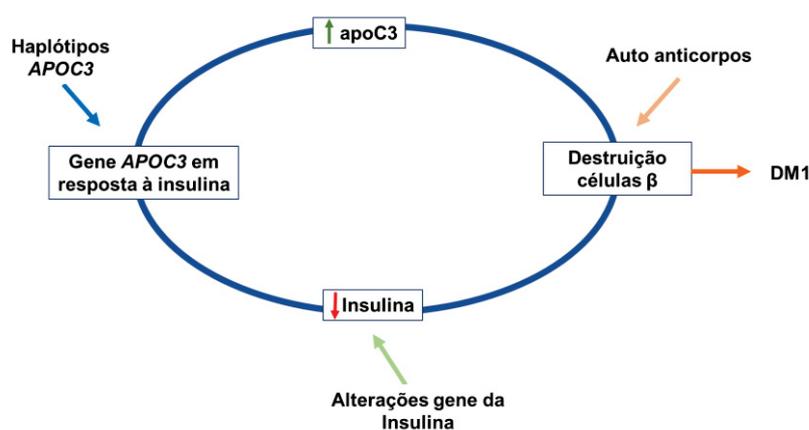
Está bem estabelecido que a resistência à insulina aumenta o risco de DCV no DM1 (DEFRONZO; HENDLER; SIMONSON, 1982; NADEAU *et al.*, 2010; PURNELL *et al.*, 2017). Embora os pacientes com DM1 frequentemente tenham perfis de lipoproteínas normais, a sensibilidade à insulina diminuída durante a adolescência e a idade adulta está associada a concentrações plasmáticas mais altas de triglicerídeos e um perfil de lipoproteína mais aterogênico (MAAHS *et al.*, 2011). Um estudo prospectivo descobriu que a resistência à insulina (mas não a glicemia) estava positivamente associada ao risco de eventos de DAC (ORCHARD *et al.*, 2003). No entanto, existem muitas perguntas sem resposta sobre a interação entre apolipoproteínas, sensibilidade à insulina e risco de DCV no DM1.

A associação entre concentrações plasmáticas reduzidas de apoC3 com perfil lipídico plasmático favorável e diminuição da progressão de DCV foi reforçada pelas observações que portadores de mutações com perda de função no gene *APOC3* resultavam numa diminuição de aproximadamente 40% nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos (NORATA *et al.*, 2015). Mutações de perda de função do gene *APOC3* em algumas coortes também foram associadas a uma redução das concentrações de LDL-C (POLLIN *et al.*, 2008; COHEN; STENDER; HOBBS, 2014). Este achado levanta a hipótese de que o efeito benéfico observada em portadores de mutações de perda de função

APOC3 poderia ser a consequência da redução das concentrações plasmáticas de LDL e não TG, e o uso de estatinas pode representar um fator de confusão quando prevalente em indivíduos não portadores da mutação (COHEN; STENDER; HOBBS, 2014). No entanto, outras variantes raras do gene *APOC3* foram associadas à diminuição das concentrações plasmáticas de TG e aumento das concentrações plasmáticas de HDL-C, mas não afetaram as concentrações de LDL-C ou de colesterol total (TIMPSON *et al.*, 2014). Estudos futuros também devem investigar a relevância das mutações de *APOC3* nas concentrações plasmáticas de LDL-C em pacientes antes do tratamento com estatina ou não tratados com estatina para apoiar ainda mais um impacto específico de *APOC3* sobre as concentrações de TG.

Hokanson e colaboradores (2006) demonstraram a associação de duas variantes genéticas, o rs2854116 (T455C) e rs2854117 (C482T), encontradas na região promotora do gene *APOC3* com DM1. Essa associação ocorre devido à falta da atenuação da expressão gênica pelos elementos de resposta à insulina (*Insulin Response Element* - IRE), pois o aumento da concentração plasmática de apoC3 leva a apoptose das células β , às quais sintetizam insulina, e isso acontece como um ciclo, em que a redução da população de células β , conseqüentemente leva à diminuição da insulina e ao aumento da concentração de apoC3 (FIGURA 20).

FIGURA 20. MODELO PROPOSTO PARA O PAPEL DE POLIMORFISMOS NO GENE *APOC3* NA ETIOLOGIA DO DM1

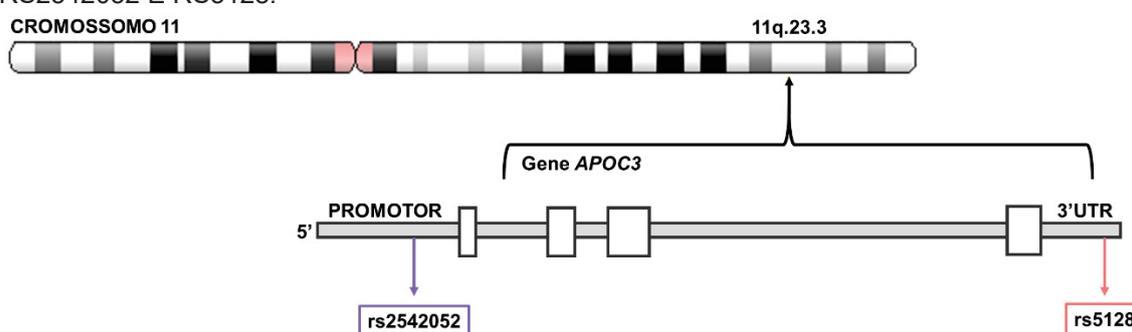


Variantes no gene *APOC3* podem atuar diretamente na destruição das células β mediada pela apoC3. O gene da *APOC3* também pode representar um fator secundário na promoção da destruição das células β associada à diminuição da insulina através do elemento de resposta negativa à insulina (IRE) localizado na região promotora do gene *APOC3*.

Fonte: Adaptado de Hokanson (2006).

A Figura 21 destaca os polimorfismos avaliados neste estudo. O polimorfismo rs2542052 (-641C/A) leva à substituição de uma citosina por uma adenina e se localiza na região promotora do gene *APOC3*. Embora não esteja localizado na região conhecida como elemento de resposta à insulina (IRE), ficou demonstrado que indivíduos portadores do genótipo CC apresentaram melhor sensibilidade à insulina (ATZMON *et al.*, 2006).

FIGURA 21. LOCALIZAÇÃO CROMOSSOMAL DO GENE *APOC3* E DOS POLIMORFISMOS RS2542052 E RS5128.



Representação esquemática dos exons, introns, região promotora, 3'UTR e localização dos polimorfismos rs2542052 e rs5128, variantes associadas ao DM1 e suas complicações, respectivamente.

FONTE: o autor, 2020.

Outra variante alélica estudada do gene *APOC3* é o polimorfismo rs5128 (3238C>G ou 3175C>G), localizado na região 3' UTR (*untranslated region*) (Figura 21). Esse polimorfismo é caracterizado por uma substituição de uma citosina por uma guanina (C>G) na posição 3238 pb (RAI *et al.*, 2016). Este polimorfismo foi associado a alterações no metabolismo lipídico (ORDOVAS *et al.*, 1991), concentrações elevadas de apoC3 e TG (SHOULDERS *et al.*, 1991; TALMUD; HUMPHRIES, 1997) e a DAC (SURGUCHOV *et al.*, 1996), todas complicações associadas ao diabetes (MALALLA *et al.*, 2019).

O possível mecanismo sob o qual o polimorfismo rs5128 modula as concentrações plasmáticas de apoC3 ainda não foi totalmente esclarecido, porém uma possível explicação seria que o alelo G aumenta a atividade transcricional do gene *APOC3* e eleva as concentrações plasmáticas da apoC3, pois Song e colaboradores (2015) evidenciaram um aumento significativo nas concentrações de apoC3 em indivíduos portadores do alelo G em comparação aos portadores do genótipo CC.

Além do papel de apoC3 no metabolismo lipídico, contribui para disfunção das células β (JUNTTI-BERGGREN *et al.*, 2004); portanto, redução das concentrações plasmáticas de apoC3 retarda o início do DM1 (HOLMBERG *et al.*, 2011). Assim, avaliação de variantes genéticas do gene *APOC3* são importantes no que diz respeito à susceptibilidade ou proteção do DM1. Se as variantes polimórficas do promotor, dentro da região IRE são de fato os elementos funcionais, a terapia precoce com insulina pode ajudar a prevenir o aumento das concentrações plasmáticas de apoC3, que leva a apoptose das células β , seguida da diminuição da secreção de insulina, caracterizando os sintomas clínicos da doença (HOKANSON *et al.*, 2006).

2.2.3.2. Gene Apolipoproteína M

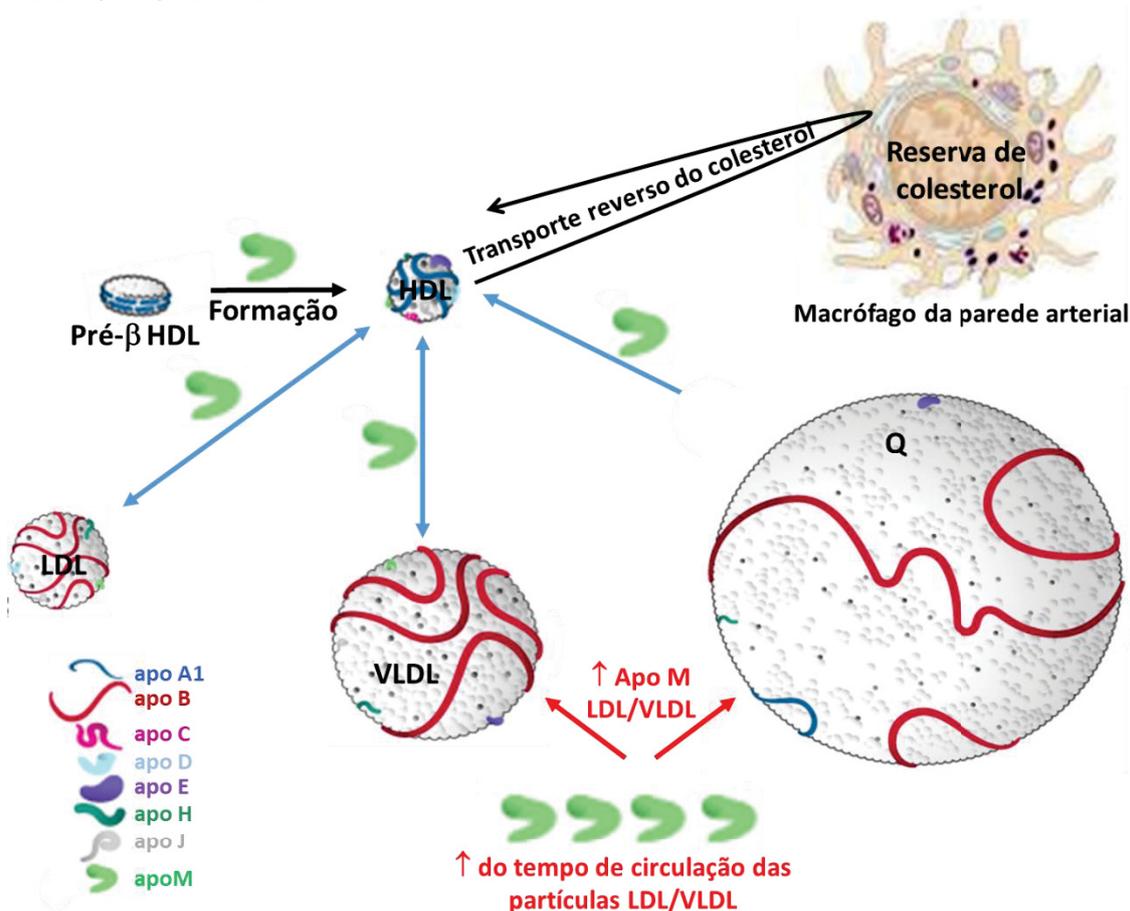
Algumas apolipoproteínas além de se encontrarem associadas às lipoproteínas também estão envolvidas na inflamação e oxidação e funcionam como chaperonas de vitaminas ou lipídios bioativos, entre outros (BERBEE; HAVEKES; RENSEN, 2005; AHNSTROM *et al.*, 2007; CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2011; NICOD; PARKER, 2013; VUILLEUMIER *et al.*, 2013). Ao contrário da maioria das apolipoproteínas, apoM apresenta um sítio de ligação hidrofóbico semelhante às lipocalinas - pequenas proteínas com um único sítio de ligação lipofílico que permite ações biológicas (DUAN; DAHLBACK; VILLOUTREIX, 2001). A apoM foi descoberta em 1999 por Xu e Dahlbäck (XU, N.; DAHLBACK, 1999), e mais tarde foi revelado que a apoM atua como o principal transportador da esfingosina 1 fosfato (sphingosine 1-phosphate - S1P) no plasma (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2011).

A apoM é uma proteína de 26 kDa e é sintetizada nos rins, fígado, e em menor extensão também nos adipócitos (DUAN; DAHLBACK; VILLOUTREIX, 2001; SRAMKOVA *et al.*, 2019). Os primeiros 20 resíduos de aminoácidos da apoM mostrou características de um peptídeo sinal, mas que permanece ligado à proteína madura devido à falta de um local de clivagem do peptídeo sinal (CHRISTOFFERSEN; AHNSTROM; *et al.*, 2008; LIU, M. *et al.*, 2015). ApoM interage principalmente com HDL na circulação, mas pode se ligar e ser trocada entre outras lipoproteínas, como LDL, VLDL e Q, por meio de sua sequência de peptídeo sinal (XU, N.; DAHLBACK, 1999).

A apoM está positivamente associada com HDL-C e LDL-C (AXLER; AHNSTROM; DAHLBACK, 2007) e é trocada entre partículas de HDL e de LDL (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2010; CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2012). Esta ação pode contribuir para a taxa de depuração da LDL circulante. Por exemplo, apoM tem uma relação inversa com a taxa catabólica da LDL em humanos (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2012). Além disso, as concentrações de apoM são afetadas pela depuração da apoB através do receptor de LDL (LDL-r). Indivíduos portadores de mutação que afeta a depuração da apoB através dos LDL-r apresentaram concentrações significativamente mais elevadas de apoM (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2012). Da mesma forma, camundongos deficientes em apoE com superexpressão de LDL-r apresentaram concentrações diminuídas de apoM e S1P em comparação com camundongos do tipo selvagem (KURANO *et al.*, 2015). Finalmente, em modelos animais sem LDL-r, a superexpressão de apoM aumenta a concentração plasmática de colesterol e o tempo de circulação das partículas de VLDL/LDL (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2010). Foi sugerido que apoM regula a formação da pré- β HDL e estimula o efluxo de colesterol a partir de células espumosas e foi mostrado que a superexpressão de apoM em um modelo de camundongo com deficiência de LDL-r protege contra aterosclerose (WOLFRUM; POY; STOFFEL, 2005). Estes resultados foram suportados por Christoffersen e colaboradores (CHRISTOFFERSEN; JAUHAINEN; *et al.*, 2008; CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2010). No entanto, também se tornou evidente que o efeito benéfico da apoM na aterosclerose foi apenas presente em modelos com colesterol LDL inalterado em comparação com controles. Caso contrário, a superexpressão de apoM leva a uma aceleração ainda maior da aterosclerose. O mecanismo para esses efeitos contrários é desconhecido, mas o impacto da apoM no tempo de circulação das partículas VLDL/LDL pode desempenhar um papel, e o impacto na atividade da lipase lipoproteica e sua modificação potencialmente prejudicial nas partículas remanescentes não pode ser excluído com os estudos atualmente disponíveis. Assim, apesar da apoM estar presente principalmente em partículas HDL, ela também afeta outras vias importantes, potencialmente neutralizando propriedades anti-aterogênicas, especialmente em casos de redução na quantidade dos LDL-r ou LDL-r com funcionalidade comprometida (YAO MATTISSON; CHRISTOFFERSEN, 2021). O papel do apoM *per se* ainda está

aberto para discussão. Um recente estudo sugere que apoM é um direcionador essencial para captação e efluxo funcional do colesterol em macrófagos de camundongo via SR-BI. Inclusive, HDL rica em apoM medeia maior efluxo de colesterol em comparação com HDL deficiente de apoM (YAO, S. *et al.*, 2021) (Figura 22).

FIGURA 22 O IMPACTO DA APOM EM SER UMA APOLIPOPROTEÍNA TROCÁVEL ENTRE AS LIPOPROTEÍNAS.



Abreviações: HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; Q: quilomícron; Apo: Apolipoproteína.

Fonte: Autor, 2021

A S1P é sintetizada intracelularmente pela fosforilação da esfingosina, o precursor direto proveniente da via metabólica da ceramida/esfingomielina. A esfingosina quinase 1 ou 2 (SphK 1 ou 2) é responsável pela síntese de S1P, enquanto a S1P fosfatase (S1PF) e a S1P liase (S1PL) são responsáveis pela desfosforilação da S1P à esfingosina ou degradação irreversível de fosfoetanolamina e hexadecanal, respectivamente (TAKABE *et al.*, 2008; SPIEGEL; MILSTIEN, 2011; MACEYKA *et al.*, 2012). A S1P está presente em

alta concentrações no plasma (200-900 nmol/L) e ainda maiores em soro (MURATA *et al.*, 2000), enquanto concentrações mais baixas são encontradas nos tecidos (SCHWAB, S. R. *et al.*, 2005; SCHWAB, S. R.; CYSTER, 2007). Foi estimado que as concentrações de S1P na linfa correspondem a 25% das concentrações plasmáticas (PAPPU *et al.*, 2007), enquanto no líquido intersticial S1P ocorre em concentrações nanomolares mais baixas (SCHWAB, S. R. *et al.*, 2005; SCHWAB, S. R.; CYSTER, 2007), gerando assim um gradiente biológico relevante. As plaquetas foram inicialmente propostas para representar o principal repositório de S1P devido à baixa atividade da S1P liase (YATOMI, 2006). A liberação de S1P armazenada durante a ativação plaquetária explica por que as concentrações de S1P são maiores no soro do que no plasma. No entanto, camundongos com deficiência de fator nuclear eritróide 2, que não têm plaquetas circulantes, apresentam concentrações normais de S1P no plasma (PAPPU *et al.*, 2007). Além disso, nenhuma correlação entre os parâmetros relacionados às plaquetas no sangue e as concentrações plasmáticas de S1P pode ser observada (OHKAWA *et al.*, 2008). Parece, portanto, que as plaquetas não contribuem significativamente para o conteúdo plasmático de S1P no estado de equilíbrio, embora possam aumentar as concentrações locais de S1P durante a formação do trombo. Os eritrócitos foram postulados como a fonte da S1P plasmática alternativa às plaquetas, uma vez que foi mostrado que são capazes de incorporar, armazenar e liberar S1P de forma eficiente para o plasma, mas não para outros ambientes livres de plasma, e a transferência de SphK1/2 tipo selvagem de eritrócitos para camundongos nocaute SphK1/2, caracterizados por S1P indetectável no sangue, restauraram as concentrações plasmáticas normais de S1P (PAPPU *et al.*, 2007). Além disso, em contraste com as plaquetas, foi relatada próxima correlação entre a contagem de eritrócitos no sangue e as concentrações plasmáticas de S1P (HANEL; ANDREANI; GRALER, 2007; OHKAWA *et al.*, 2008). Enquanto experimentos usando modelos animais com deficiência seletiva de SphK em células hematopoiéticas adicionalmente suportam o papel dos eritrócitos na regulação da S1P plasmática, Venkataraman e colaboradores (2008) demonstraram que existem outras fontes importantes de S1P e sugeriram que o endotélio vascular pode contribuir significativamente para as concentrações plasmáticas de S1P (Figura 23).

A S1P exerce sinalização autócrina e parácrina via uma família de receptores acoplados à proteína G. Os receptores para S1P são conhecidos como receptores S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 e S1P5 (S1PR1-5). Os receptores S1P1, S1P2 e S1P3 são expressos em tecidos vasculares, enquanto S1P4 e S1P5 são restritos ao sistema hematopoiético e nervoso (HLA; MACIAG, 1990; XIONG; HLA, 2014). Desta forma, S1P é capaz de regular vários processos biológicos, tais como tráfico de células imunes, angiogênese, migração celular e sobrevivência celular (BLAHO; HLA, 2014) (Figura 23).

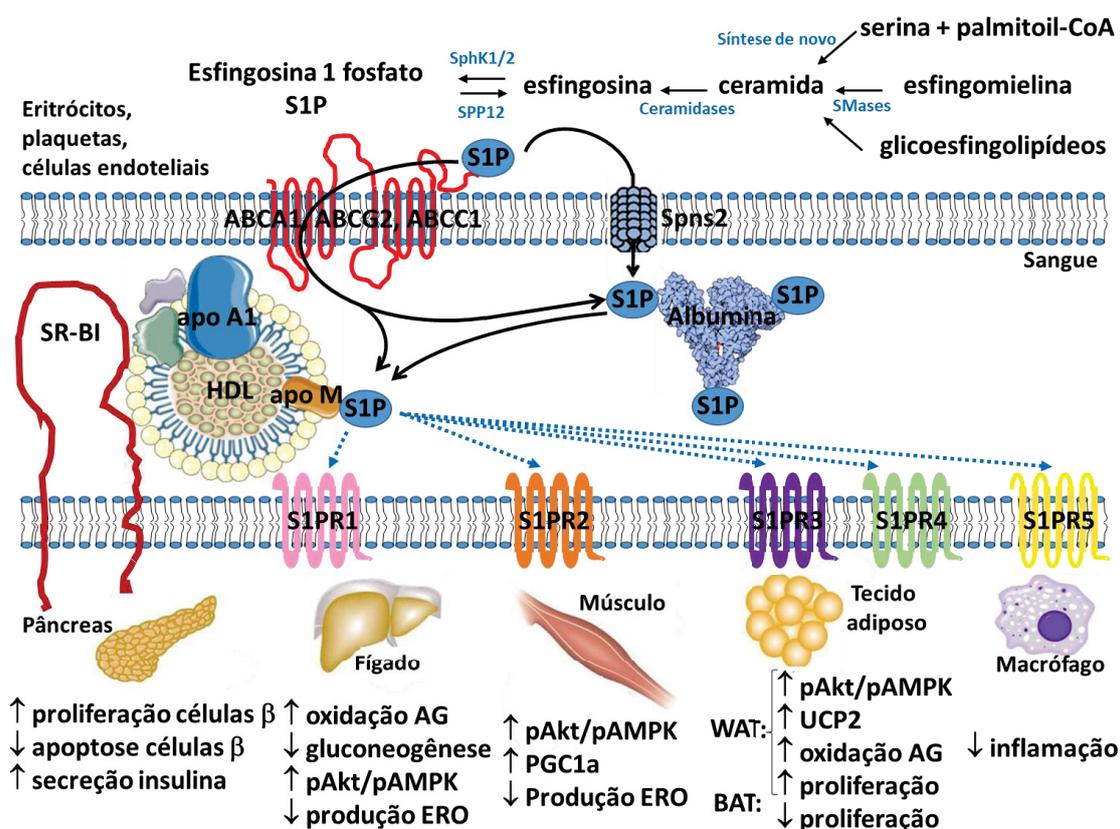
A apoM presente partículas HDL é a principal transportadora da S1P circulante no plasma (~55%), e o restante (~35%) está ligado à albumina ou à apoA-IV ou permanece na forma livre (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2011) (Figura 23). Apenas 10% da S1P plasmática reside em outras lipoproteínas, principalmente LDL. Os primeiros estudos *in vitro* demonstraram que a S1P associada a HDL era tão potente como a S1P ligada à albumina para estimular respostas de curto prazo em células, como a ativação da proteínas quinases ativadas por mitógenos (*mitogen activated protein kinases* - MAPK) e óxido nítrico sintase endotelial (*endothelial nitric oxide synthase* - eNOS), embora significativamente mais potente do que a S1P ligada à albumina na estimulação de funções de longo prazo, como a sobrevivência celular (KIMURA *et al.*, 2001; KIMURA *et al.*, 2006; SATO; OKAJIMA, 2010). Wilkerson e colaboradores (WILKERSON *et al.*, 2012) mostraram que S1P associado a HDL sustenta barreira de células endoteliais por mais tempo do que a S1P presente na albumina. Além disso, esses autores descobriram que HDL-S1P, mas não a albumina-S1P reduz a degradação da proteína S1P1 e promove a reciclagem do receptor na superfície da célula, fornecendo evidências claras de que o tipo de transportador S1P é um fator determinante neste processo (WILKERSON *et al.*, 2012). S1P associada a HDL possui um tempo de meia-vida quatro vezes superior a S1P ligada à albumina (SATO; OKAJIMA, 2010). Coletivamente, essas observações sugerem que HDL pode representar um reservatório estável de S1P totalmente ativa no sangue, modulando as ações anti-aterogênicas de curto e longo prazo. De forma contrária, por causa de sua alta concentração no plasma, a albumina pode atuar como um reservatório e uma armadilha molecular para S1P, evitando efetivamente a superestimulação de receptores S1P.

Embora a HDL pareça extrair eficazmente a S1P das membranas dos eritrócitos (BODE *et al.*, 2010), os mecanismos subjacentes ao acúmulo de S1P nesta lipoproteína permanecem obscuros (Figura 23). A proteína homóloga de solteirona 2 (*Spinster homolog 2* - SPNS2) é um transportador específico envolvido na mobilização S1P das células (NISHI *et al.*, 2014). Embora SPNS2 afete principalmente as concentrações de S1P no compartimento linfático, no entanto, contribui para a exportação S1P das células endoteliais e a concentração de S1P ligada a HDL no plasma é menor em animais com deficiência de SPNS2 (FUKUHARA *et al.*, 2012; HISANO *et al.*, 2012; MENDOZA *et al.*, 2012; NAGAHASHI *et al.*, 2013). No entanto, evidências que sugeriram uma contribuição direta de SPNS2 para a carga S1P transportada para as partículas HDL não foram fornecidas até o momento. Os transportadores ABC podem desempenhar um papel fundamental na mediação da exportação de S1P das células. Foi demonstrado que a glibenclamida, um inibidor não específico de ABC transportadores, suprime a liberação de S1P das plaquetas (KOBAYASHI, N. *et al.*, 2006) e eritrócitos (KOBAYASHI, N. *et al.*, 2009). Outros estudos demonstraram ainda que ABCC1 está envolvido na exportação de S1P de mastócitos, células endoteliais, adipócitos, células de Langerhans e, juntamente com ABCG2, na liberação de S1P induzida por estradiol de células de câncer de mama MCF-7 (TAKABE *et al.*, 2010; JAPTOK *et al.*, 2012; CARTWRIGHT *et al.*, 2013; ITO, S. *et al.*, 2013). A última observação pode explicar as concentrações plasmáticas mais elevadas de S1P encontradas em mulheres do que em homens com a mesma idade e na pré-menopausa do que nas mulheres na pós-menopausa (GUO *et al.*, 2014). À semelhança de SPNS2, a evidência que indica uma interação direta entre ABCC1 e as partículas HDL está faltando. Contudo, HDL é bem conhecida por interagir com outros membros da família de transportadores ABC, como ABCA1 e ABCG1 e, assim, promover o efluxo de colesterol e fosfolipídios das células. Poucos estudos sugeriram que ABCA1 pode ser responsável pelo enriquecimento de S1P e pela geração de lipoproteínas semelhantes a HDL no sistema nervoso central (SATO *et al.*, 2007a, 2007b). No entanto, ainda não foi demonstrado que este mecanismo possa contabilizar o acúmulo de S1P nas lipoproteínas plasmáticas.

A apoM se liga a HDL e S1P se liga a seus receptores, mas como o S1P é liberada do complexo e se apoM interage diretamente com os receptores S1P

ou se S1P interage com outros receptores, ainda não se sabe (Figura 23). Um candidato a receptor importante pode ser o receptor endotelial *scavenger* classe B tipo 1 (*scavenger receptor class B type 1* - SR-BI), um sensor de colesterol responsável pela captação de ésteres de colesterol derivados da HDL (SADDAR *et al.*, 2013). Especificamente, a ligação da S1P a HDL permite proximidade entre S1P1 e SR-BI na membrana plasmática seguida por uma liberação de cálcio intracelular e inicialização da S1P1 (SADDAR *et al.*, 2013). Esse processo não pode ocorrer pela HDL sem S1P ou pela S1P sozinha. Sugere-se que a HDL contendo apoM fornece tal ponte ou opção de comunicação entre os receptores SR-BI e o receptor S1P1. No entanto, Sattler e colaboradores (2015) sugerem que HDL sem apoM também pode ser carregada com S1P, pelo menos *in vitro* fornece funcionalidades biológicas relevantes.

FIGURA 23. BIOGÊNESE DE S1P E PAPEL POTENCIAL DE APOM E S1P EM DIABETES, OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA



As ceramidas são formadas por síntese de novo ou por degradação de esfingomielinas e glicoesfingolípideos. A hidrólise do ácido graxo O-ligados por ceramidases produz esfingosina, que é fosforilada em esfingosina 1 fosfato (S1P) pela esfingosina quinases 1 ou 2 (SphK1/2). Esta fosforilação pode ser revertida pelas S1P fosfatases 1 e 2 (SPP1/2). A S1P intracelular é efluxada pelo homólogo de solteirona 2 (*Spinster homolog 2* - SPNS2). O acoplamento das partículas de HDL a SR-BI mediado por apoA-1 pode facilitar a sinalização dependente de S1P. ApoM ligado a S1P interage com receptores S1P (S1PRs) para regular várias funções celulares.

Com relação à regulação do metabolismo da glicose e resistência à insulina, essas funções incluem a promoção da sobrevivência das células β pancreáticas e secreção de insulina, inibição da produção de glicose no fígado, aumento da oxidação de ácidos graxos no fígado, músculo e tecido adiposo e inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em hepatócitos e miócitos. Indiretamente, S1P melhora a sensibilidade à insulina, suprimindo as ações inflamatórias dos macrófagos. WAT: tecido adiposo branco (*white adipose tissue*); BAT: tecido adiposo marrom (*brown adipose tissue*); pAkt: Akt fosforilada (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog* ou proteína quinase B - PKB); pAMPK: proteína quinase ativada por AMP fosforilada (*phosphorylated AMP-activated protein kinase*); PGC1 α , coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (peroxisome proliferator-activated receptor γ coativador 1-a); SMase: esfingomielinase (*sphingomyelinase*); UCP2: proteína desacopladora mitocondrial 2 (*mitochondrial uncoupled protein 2*); AG: ácidos graxos.
 FONTE: Adaptado de Poti e colaboradores (2014) e Yalcinkaya e von Eckardstein (2020).

Alterações nas concentrações de apoM e S1P, afetando o complexo apoM/S1P estão relacionados com vários estados fisiopatológicos em várias doenças (Figura 23). O aumento das concentrações plasmáticas de triglicerídeos é um fenômeno bem conhecido relacionadas a distúrbios cardiovasculares e metabólicos. O triglicerídeo plasmático é transportado principalmente pelo Qs e partículas de VLDL, e inversamente associado ao colesterol HDL em humanos. O *turnover* dos triglicerídeos é um processo dinâmico que controla o armazenamento de lipídios e o catabolismo no corpo. O tecido adiposo branco (*white adipose tissue* - WAT) é responsável pelo armazenamento de lipídios, enquanto o tecido adiposo marrom (*brown adipose tissue* - BAT) pode metabolizar e utilizar lipídios para obter energia e produção de calor (WHITE; RAVUSSIN, 2019). As células endoteliais fornecem não apenas uma barreira natural entre as lipoproteínas circulantes e os adipócitos circundantes mas são uma plataforma importante para interações entre lipase lipoproteica e fatores regulatórios nas lipoproteínas, como apo CII, apo CIII e apo AV (REMALEY; DAYSPRING; WARNICK, 2018). Foi mostrado que altas concentrações de apoM ou S1P aumentam as concentrações plasmáticas de triglicerídeos em modelos animais (HAJNY *et al.*, 2021). Recentemente, descobriu-se que a deficiência de apoM reduz os triglicerídeos pós-prandiais, aumenta a atividade da lipoproteína lipase pós-heparina e a atividade do tecido adiposo marrom (*brown adipose tissue* - BAT) em camundongos e essas ações foram dependentes de S1P (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2018). Também foi mostrado que altas concentrações de apoM e S1P diminuem o *turnover* dos triglicerídeos parcialmente explicado pela elevada sinalização apoM/S1P que reduz a captação de lipídios no tecido adiposo via atividade da lipase e fator de

crescimento de fibroblastos 21 (*fibroblast growth factor 21*- FGF21) (HAJNY *et al.*, 2021). No entanto, se apoM/S1P afetam diretamente a atividade da lipase, incluindo a lipase lipoproteica ou se modulam a integridade endotelial e, assim, afetando o *turnover* de triglicerídeos precisa de mais investigações, mas pelo menos em animais, concentrações elevadas de apoM ou S1P aumentam as concentrações plasmáticas de triglicerídeos.

Na obesidade ocorre desregulação do metabolismo lipídico com HDL baixo e triglicerídeos elevados, resistência à insulina (RI), aumento do WAT e diminuição do BAT. A supernutrição desencadeia nas células WAT um perfil inflamatório de baixo grau, propagando assim RI e distúrbio metabólico (MCLAUGHLIN *et al.*, 2016). Modelos de ratos obesos e diabéticos apresentam concentrações plasmáticas mais baixas de apoM e mais elevadas de S1P (XU, N.; NILSSON-EHLE; *et al.*, 2004; KOWALSKI *et al.*, 2013; NOJIRI *et al.*, 2014; KURANO *et al.*, 2020). Também foi encontrado redução nas concentrações plasmáticas de apoM em indivíduos obesos (CHRISTOFFERSEN, 2021) e com DM2 (PLOGGAARD *et al.*, 2009). Uma provável explicação para a redução de apoM é a regulação mediada pela insulina através do fator de transcrição FOXA2, suprimindo a expressão de apoM (WOLFRUM *et al.*, 2008). A razão para o aumento de S1P é, entretanto, é desconhecida. Presumivelmente, apoM/S1P exerça seu efeito protetor contra a resistência à insulina por ativação de vias de sinalização de insulina, como o Akt (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog* ou proteína quinase B - PKB) e proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (*AMP-activated protein kinase* - AMPK), e melhora das funções mitocondriais por meio da regulação positiva na expressão de Sirtuina 1 (*sirtuin 1* - SIRT1), pelo consumo de oxigênio e expressão de proteínas mitocondriais, como a proteína desacopladora mitocondrial 2 (*mitochondrial uncoupled protein 2* - UCP2). A proteína SIRT1 é expressa na maioria das partes do corpo, incluindo cérebro, coração, rim, fígado, pâncreas, baço, músculo esquelético, tecido endotelial e tecido adiposo branco. Pela expressão e ativação de SIRT1, a modulação de suas vias a jusante ocorre ao direcionar várias proteínas celulares, como receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (*peroxisome proliferators-activated receptor gamma* - PPAR γ) e seu coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (*peroxisome proliferator-activated receptor g coactivator 1 alpha* - PGC-1 α) e

proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (*AMP-activated protein kinase* - AMPK) (VALLE *et al.*, 2005). Essas ações de apoM/S1P parecem ser mediadas por meio da ativação dos receptores S1P1R e/ou S1PR3 (KURANO *et al.*, 2020).

Estudos anteriores indicaram efeitos antidiabéticos da S1P. A superexpressão da enzima geradora de S1P, a esfingosina quinase 1 (*sphingosine kinase 1* - SPHK1) reduziu a resistência à insulina do músculo em camundongos alimentados com dieta rica em gordura (BRUCE *et al.*, 2012). A produção reduzida de S1P por inibição farmacológica de SPHK ou por nocaute de *Sphk1* levou a diminuir a massa de células β e a secreção de insulina (CANTRELL STANFORD *et al.*, 2012; QI, Y. *et al.*, 2013). A administração intraperitoneal de S1P induziu em camundongos com diabetes induzido por estreptozotocina a proliferação das células β e anulação da apoptose (16). Em experimentos *ex vivo*, S1P protege as células β isoladas de ilhotas murinas e humanas da apoptose induzida por glicose e IL-1 β (RUTTI *et al.*, 2009). ApoM e S1P também podem exercer efeitos antidiabéticos indiretos adicionais por inibição das ações inflamatórias das células imunes (BISGAARD; CHRISTOFFERSEN, 2019). No entanto, alguns dados contradizem as ações antidiabéticas de S1P e apoM. Em comparação com os camundongos do tipo selvagem, os camundongos ApoM nocauteada são caracterizados por tecido adiposo marrom com maior massa, normalização acelerada de hipertrigliceridemia pós-prandial e proteção contra obesidade induzida por alimentação rica em gordura (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2018). O tratamento dos camundongos com fingolimode, que inibe os cinco receptores S1P e está em uso clínico para o tratamento da esclerose múltipla, melhorou tanto a secreção e ação periférica da insulina, bem como esteatose hepática induzida por alimentação com dieta rica em gordura (ZHAO, Z. *et al.*, 2012; BRUCE *et al.*, 2013; RAVICHANDRAN *et al.*, 2019). Da mesma forma, a interferência genética com S1PR2 e *Sphk2* em camundongos resultaram na melhoria da função das células β e resistência à insulina (JAPTOK *et al.*, 2015; ROHRBACH *et al.*, 2019).

Ao testar a relevância de suas descobertas em humanos, Kurano e colaboradores (2020) encontraram concentrações plasmáticas significativamente reduzidas de apoM em pacientes com diabetes, em

comparação com indivíduos controle euglicêmicos. No entanto, essas diferenças foram pequenas. Da mesma forma, correlação entre as concentrações plasmáticas de apoM e índices de resistência à insulina eram fracas, mas estatisticamente significativos (8). Associações fracas semelhantes e correlações entre apoM e S1P com T2D e medidas de resistência à insulina, respectivamente, foram encontradas em alguns, mas não em todos os estudos anteriores (MEMON *et al.*, 2014; BISGAARD; CHRISTOFFERSEN, 2019). Eles não podem ser interpretados como qualquer indicação de causalidade, uma vez que as concentrações plasmáticas de apoM e S1P se correlacionam com as concentrações plasmáticas de HDL-C e apoA-I (KARUNA *et al.*, 2011) de modo que a diminuição no número de partículas HDL no DM2 pode causar secundariamente uma diminuição de apoM e S1P. Em concordância com esta interpretação, Kurano e colaboradores (2020) observou aumento ao invés de diminuição de apoA-I, apoM e S1P em camundongos com obesidade induzida por dieta. No entanto, a diminuição das concentrações plasmáticas de apoM em pacientes MODY3 (10) ou a associação de polimorfismos de nucleotídeo único de *APOM* com diabetes (26) pode ser interpretado como dicas iniciais para causalidade. Um estudo recente realizou uma análise de randomização Mendeliana aplicada a duas coortes dinamarquesas, mas não puderam apoiar a causalidade entre redução na apoM geneticamente determinada e risco para o DM2 (HAJNY *et al.*, 2020). Outros estudos sugerem o contrário e enfatizam o fato de que as associações entre apoM e DM2 pode ser influenciada por outros fatores de confusão, como etnia (MEMON *et al.*, 2014; TAGELDEEN *et al.*, 2021). Kobayashi e colaboradores (2021) demonstraram que em condições de elevadas concentrações de glicose, apoM polimeriza e demonstra um enfraquecimento na capacidade de se ligar a S1P, resultando em uma diminuição nas partículas de HDL contendo S1P e uma atenuação em várias funções HDL.

ApoM e S1P individualmente fornecem potencial anti-aterogênico. No entanto, como discutido acima, altas concentrações de apoM ou S1P podem estar ligadas à dislipidemia. Portanto, podem existir algumas discrepâncias na compreensão do papel da apoM/S1P na aterogênese. O atual paradigma do desenvolvimento de placa de aterosclerose sugere que lipoproteínas contendo apoB são a causa primária da iniciação e progressão da placa aterosclerótica

devido à carga exagerada de colesterol das partículas de LDL e VLDL contendo apoB, mas também uma modificação constante de lipoproteínas ricas em triglicerídeos induzindo retenção de partículas remanescentes maiores na parede do vaso (BOREN; WILLIAMS, 2016). Como já mencionado, apoM pode afetar a taxa de renovação das partículas de LDL, aumentar o tempo de circulação das partículas VLDL/LDL e afetam a atividade da lipase lipoproteica pós-heparina (potencialmente um modulador de partículas remanescentes). Além disso, a sinalização apoM/S1P associada a HDL promove um sistema vascular saudável e tem impacto em várias funções funcionais da HDL potencialmente anti-aterogênicas. A regulação induzida por S1P dos sistemas vascular e imunológico revelou uma interação complexa influenciada pela apoM ligada à HDL. Foi mostrado que S1P pode inibir a apoptose de macrófagos e, portanto, a progressão de placas ateroscleróticas (FEUERBORN *et al.*, 2017). Em consonância com isso, existem evidências de que as células apoptóticas liberam S1P como um quimio-atraente para células inflamatórias (WEIGERT; OLESCH; BRUNE, 2019). Estudos mostraram que concentrações reduzidas de apoM foram associados ao risco de DCV em pacientes com insuficiência renal crônica (SORENSEN *et al.*, 2018) e partículas de HDL com maior conteúdo de S1P foi associado com melhorada das propriedades cardioprotetoras (BRINCK *et al.*, 2018). Com conhecimento atual disponível, é muito cedo para concluir se as alterações nas concentrações plasmáticas de apoM ou de S1P em humanos estão associados a um risco aumentado de DCV. Da mesma forma, mais estudos serão necessários para avaliar se o complexo apoM/S1P desempenha um papel ativo no desenvolvimento da formação da placa em humanos (YAO MATTISSON; CHRISTOFFERSEN, 2021).

A inflamação vascular é um impulsionador da disfunção endotelial e DCV. Além disso, foi demonstrado que as células endoteliais possuem propriedades imunorreguladoras. Este novo paradigma abriu novos estudos na imunomodulação de células endoteliais, secreção de citocinas e apresentação antígeno (KRUGER-GENGE *et al.*, 2019). Apesar do conhecimento limitado sobre o papel da apoM na inflamação e respostas imunológicas, extensas pesquisas corroboram o efeitos anti-inflamatórios da S1P (KRUGER-GENGE *et al.*, 2019). A integridade das células endoteliais que revestem os vasos é crucial para a homeostase vascular e a morte das células endoteliais, desencadeia o

vazamento vascular e promove inflamação nos tecidos adjacentes (WINN; HARLAN, 2005). Além disso, as células apoptóticas endoteliais tornam-se pró-coagulantes e podem provocar formação de coágulos sanguíneos (BOMBELI *et al.*, 1997). Assim, o aumento da apoptose das células endoteliais está associado a várias patologias cardiovasculares, em particular com trombose e aterosclerose (AFFARA *et al.*, 2007). As partículas de HDL são potentemente anti-aterogênicas e reduzem apoptose de células endoteliais (KIMURA *et al.*, 2001; NOFER *et al.*, 2001). Efluxo de colesterol é um dos mecanismos subjacentes à proteção de HDL do endotélio e, mais importante, a HDL contendo ApoM aumenta efluxo de colesterol (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2006; PLOMGAARD *et al.*, 2009). Da mesma forma, sabe-se que S1P atenua a apoptose em células endoteliais (KIMURA *et al.*, 2001; KIMURA *et al.*, 2003). Foi mostrado que as ações citoprotetoras do apoM/S1P no endotélio são mediadas pelos receptores S1PR1 e S1PR3 via fosforilação da Akt e proteína quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (*extracellular signal-regulated kinases - ERK1/2*) (KIMURA *et al.*, 2003).

Devido à expressão onipresente e sobreposta dos receptores S1P em vários órgãos e sistemas, o eixo S1P (S1P, S1PRs, SPHK, SP1F e S1PL) foi implicado em várias doenças imunomediadas, como esclerose múltipla, artrite reumatoide, doenças inflamatórias intestinais e acidente vascular cerebral isquêmico (SNIDER, 2013; BRUNKHORST; VUTUKURI; PFEILSCHIFTER, 2014; MACEYKA; SPIEGEL, 2014). A S1P é a principal reguladora da saída de linfócitos dos órgãos linfoides secundários na circulação sistêmica (CYSTER; SCHWAB, 2012). A expressão dos receptores S1P1 é necessária para a saída das células B e T dos linfonodos e para a saída das células T maduras e células T natural *killer* (NK) do timo (SCHWAB, S. R.; CYSTER, 2007; SPIEGEL; MILSTIEN, 2011). A expressão dos receptores S1P1 também está associada à ativação de células T (RIVERA; PROIA; OLIVERA, 2008; GARRIS *et al.*, 2014). A sinalização S1P também está implicada na diferenciação de células T auxiliares (*T helper* – TH) imunidade adaptativa. A sinalização S1P regula o desenvolvimento e diferenciação das células T auxiliares, incluindo desenvolvimento TH1/TH17 e o balanço entre as células TH1/T reguladoras (Treg) (LIU, G. *et al.*, 2010; GARRIS *et al.*, 2013). S1P1 regula negativamente a diferenciação das células Treg e suas funções supressoras através da via Akt-

proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin* - mTOR) (LIU, G. *et al.*, 2009). Além disso, os camundongos transgênicos sem expressão de S1P1 mostraram tolerância imunológica diminuída e desenvolvem autoimunidade relacionada à idade à resposta TH1 aumentada, um dos principais subconjuntos de células TH patogênicas que causam doenças autoimunes (LIU, G. *et al.*, 2009). A sinalização S1P também promove a diferenciação TH17 *in vitro* e *in vivo* (HUANG, M. C. *et al.*, 2007; LIAO; HUANG; GOETZL, 2007). Foi mostrado resposta imune TH17 dominante mediada pelos receptores S1P1 com expressão citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-17 (GARRIS *et al.*, 2013) (Figura 24).

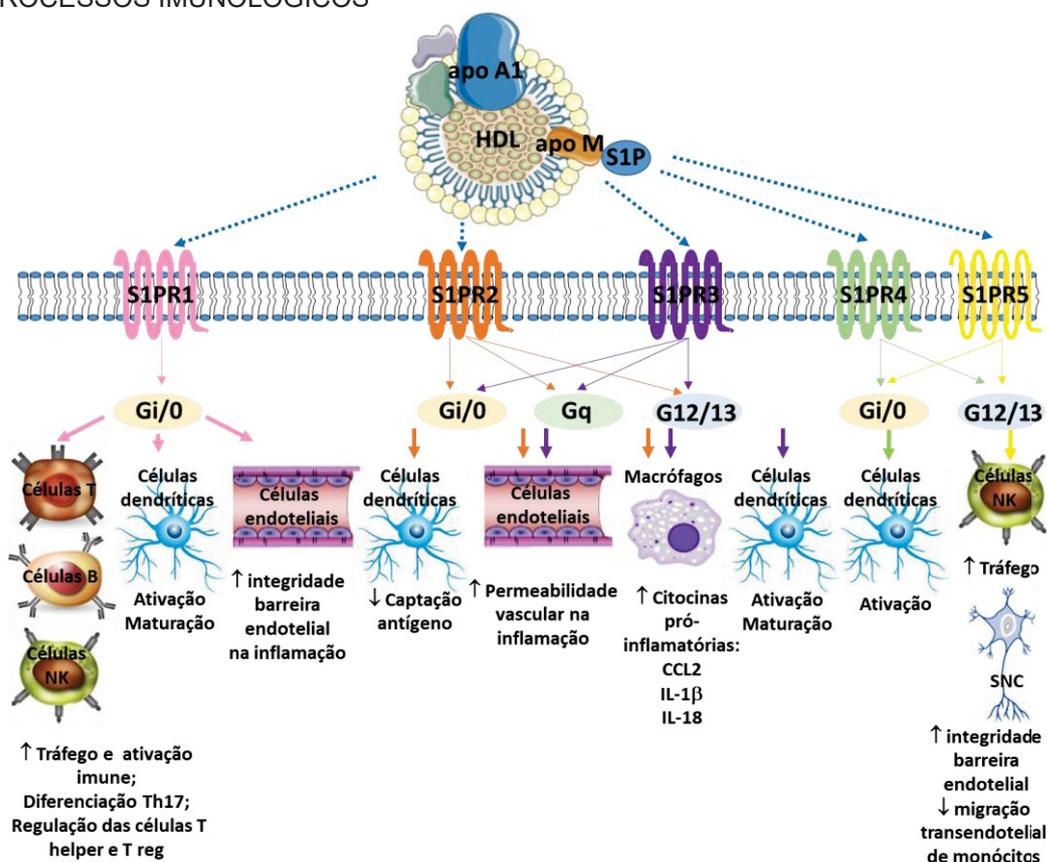
Devido à expressão onipresente de S1P e S1PRs em vários tecidos, a sinalização S1P pode ser pró ou anti-inflamatória dependente do contexto e da fonte do tecido (MACEYKA; SPIEGEL, 2014). Após a exposição à endotoxina, os macrófagos expressam altas concentrações de S1P, que ativam OS receptores S1P2 e S1P3 desencadeando a expressão de mediadores pró-inflamatórios CCL2, IL-1 β e IL-18 (SKOURA *et al.*, 2011). Com relação às células dendríticas (CD) S1P estimula ativação e maturação via receptores S1P1 e S1P3 e inibe a captura de antígenos através da macropinocitose via S1PR2 (ARLT *et al.*, 2014). Foi sugerido também que os receptores S1P4 modulam a diferenciação das CD, especialmente CD plasmocitoide, e podem influenciar a diferenciação de células TH17 (SCHULZE *et al.*, 2011; DILLMANN *et al.*, 2015), sugerindo uma potencial contribuição de S1P4 na autoimunidade (Figura 24).

O aumento da permeabilidade vascular ocorre no local da inflamação, permitindo a entrada de proteínas plasmáticas e células imunes no órgão-alvo, como um mecanismo de proteção para eliminar patógenos e restos celulares. No entanto, rompimento da barreira vascular também pode potencialmente exacerbar a inflamação e causar irreversibilidade no dano ao tecido (TSAI; HAN, 2016). Sinalização de receptores S1P via diferentes subunidades da proteína G podem desempenhar papéis diferenciais na manutenção da integridade da barreira. Por exemplo, a ativação de S1P1 acoplado a Gi/o, em células endoteliais aumenta integridade de barreira (DUDEK *et al.*, 2010), enquanto receptores S1P2 e S1P3, acoplados a Gi/o, Gq e G12/13 promovem aumento da capacidade vascular permanente durante a inflamação. Também foi mostrado que a modulação do receptor S1P nas células endoteliais e astrócitos reduziu a

migração de leucócitos através da barreira endotelial *in vitro*, implicando funções duplas da sinalização S1P no sistema vascular e células imunes no controle da inflamação (SPAMPINATO *et al.*, 2015) (Figura 24).

O receptor S1P5 é altamente expresso no sistema nervoso central, particularmente em oligodendrócitos e endotélio cerebral. Ativação de S1P5 das células endoteliais no cérebro *in vitro* aumentaram a integridade da barreira e reduziram a migração transendotelial de monócitos (VAN DOORN *et al.*, 2012). Foi mostrado que ceralifimod (ONO-4641), um agonista altamente potente e seletivo para os receptores S1P1/S1P5, que induz a regulação negativa de S1P1, apresenta benefícios terapêuticos claros em um modelo DM1 em camundongo, provavelmente exercendo suas ações imunomoduladoras pela inibição da infiltração de linfócitos nas lesões da doença, regulando a recirculação de linfócitos sem afetar suas funções (SHIOYA *et al.*, 2021). Além disso, a expressão do receptor S1P5 é requerida para saída das células NK dos nódulos linfáticos e medula óssea (JENNE *et al.*, 2009).

FIGURA 24. VIAS DE SINALIZAÇÃO S1P E RECEPTORES S1P NA INFLAMAÇÃO E PROCESSOS IMUNOLÓGICOS



Os receptores S1PR são acoplados a diferentes proteínas G (Gi/o, Gq e G12/13) para regular respostas biológicas a jusante. A sinalização S1P-S1P1 está envolvida no tráfego imunológico e ativação imunológica. A sinalização S1P-S1P1 também regula o desenvolvimento das células T auxiliares (TH) e T reguladoras (TReg) através intercomunicação das vias de sinalização envolvendo a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin* - mTOR) ou Janus quinase- proteína do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (*Janus kinase-signal transducer and activator of transcription* – JAK-STAT3). Os receptores S1P2 e S1P3 estão envolvidos na regulação da barreira endotelial, macrófagos e funções das células dendríticas. O receptor S1P4 também está envolvido na ativação das células dendríticas. O receptor S1P5 é expresso em células natural *killer* (NK) e células do sistema nervoso central (SNC).

Fonte: Adaptado de Tsai e Han (2016).

A apoM plasmática é principalmente derivada dos hepatócitos, no entanto, a ApoM expressa nos rins pode ser apenas metabolizado nos rins (XU, N.; DAHLBACK, 1999). O gene *APOM* está localizado dentro da região MHC de classe III do genoma contendo genes envolvidos no sistema imunológico, e, portanto, especula-se que *APOM* pode ser regulado por estímulos inflamatórios. Esta vinculação foi apoiada por um estudo que mostrou que a inflamação resulta na diminuição da expressão de *APOM* (FEINGOLD *et al.*, 2008). Além disso, várias citocinas, por exemplo, fator de crescimento transformador alfa (*transforming growth factor alpha* - TGF α), fator transformador fator de crescimento beta (*transforming growth factor beta* – TGF β), fator de crescimento epidermal (*epidermal growth fator* - EGF), e fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth fator* - HGF), regulam negativamente a expressão de *APOM* em células hepáticas, com TGF β tendo o efeito mais pronunciado (XU, N.; HURTIG; *et al.*, 2004). Em contraste, interleucina 1 alfa (*interleukin 1 alpha* - IL-1 α) e fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha* - TNF α) não afetam a expressão de *APOM* em células HepG2, enquanto a estimulação com fator ativador de plaquetas (*platelet-activating fator* - PAF) aumentou a expressão de *APOM*.

A expressão de *APOM* no fígado também é regulada por outros fatores transcricionais e hormônios (REN *et al.*, 2015) (Tabela 2). O fator nuclear de hepatócitos 1 α (HNF-1 α) e o fator nuclear de hepatócitos 4 α (HNF-4 α) são fatores de transcrição heptonucleares que desempenham papéis essenciais na regulação da expressão gênica associada ao metabolismo de lipídeos (KUO *et al.*, 1992; KRITIS *et al.*, 1993; KOUKOS *et al.*, 2007) e glicose (PONTOGLIO, 2000). HNF-1 α está sob o controle de HNF-4 α e na região promotora do gene *APOM* existem elementos de resposta conservados para ligar HNF-1 α (-55 a

-41) (RICHTER, S. *et al.*, 2003) e para HNF-4 α (-33 a -21) (MOSIALOU; ZANNIS; KARDASSIS, 2010). Foi mostrado que TGF β regula negativamente a expressão de *APOM* através da ativação da via Quinase 1 ativada por fator transformante de crescimento-beta 1–proteína quinase NH₂-terminal Jun–Janus cTAK-1-JNK-c-Jun (transforming growth factor- β -activated kinase 1 - TAK1 – c-Jun N-terminal cinase - JNK – Janus c – c Jun) (REN *et al.*, 2017), como resultado da ligação competitiva do fator transcricional Jun e HNF-1 α ao mesmo elemento regulador (-55 a -41) na região promotora de *APOM* (MOSIALOU; KRASAGAKIS; KARDASSIS, 2011). HNF-4 α ativa a produção de ApoM no fígado, e SIRT1 pode promover a expressão de HNF-4 α (MOSIALOU; ZANNIS; KARDASSIS, 2010; PALU; THUMMEL, 2016) (Figura 25).

O receptor homólogo do fígado (*liver receptor homolog* - LRH-1) é um membro da família de receptores nucleares de hormônio que se liga à sua sequência alvo como um monômero. LRH-1 afeta a expressão de genes que controlam a biossíntese de ácidos biliares (DEL CASTILLO-OLIVARES; GIL, 2000) e o transporte reverso do colesterol (LUO, Y.; LIANG; TALL, 2001; SCHOONJANS *et al.*, 2002) é um regulador negativo das respostas de fase aguda hepática (VENTECLEF *et al.*, 2008). Venteclef e colaboradores (2008) identificaram um elemento de resposta a LRH-1 em torno -90 pares de base na região promotora do gene *APOM* humano e de camundongo e mostraram que LRH-1 estimula a transcrição de *APOM* em cultura de células hepáticas. Ligantes do receptor farnesóide X (*farnesoid X receptor* - FXR) reprimem a expressão do gene dependente de LRH-1 via o pequeno parceiro heterodímero (*small heterodimer partner* - SHP) (LU *et al.*, 2000) SHP inibe a transcrição de genes dependente de LRH-1, possivelmente pela produção de heterodímeros não funcionais (SEOL *et al.*, 1998; LU *et al.*, 2000) (Figura 25).

Outros membros da superfamília de receptores nucleares também podem estimular ou inibir a transcrição do gene *APOM* no mesmo sítio de ligação do HNF-4 α , incluindo homodímeros de receptor do retinoíde X (*retinoid X receptor* – RXR) e heterodímeros de RXR com o receptor do ácido retinóico (RAR) e receptor do hormônio tireoidiano (thyroid hormone receptor - TR), sugerindo que o gene *APOM* está igualmente sob o controle dos receptores para ácido retinóico, hormônio da tireoide, fibratos e oxisteróis (ZANNIS *et al.*, 2001a; ZANNIS *et al.*, 2001b) (Figura 24). A estimulação do fator de transcrição receptor

X hepático (*liver X receptor* – LXR) com o ligante artificial T0901317 resulta na diminuição da expressão de *APOM* no fígado, tanto *in vivo* e *in vitro* (ZHANG, X. *et al.*, 2008; DI *et al.*, 2012), embora a mesma ativação LXR leva ao aumento da expressão de *APOM* no intestino (CALAYIR *et al.*, 2008). Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (*peroxisome proliferator-activated receptor* – PPAR) são fatores de transcrição ativados por ligante que compreendem três subtipos: PPAR α , PPAR γ e PPAR β/δ . Foi mostrado em ensaios *in vitro* (células HepG2) a expressão de *APOM* foi regulada negativamente por PPAR β/δ e não foi influenciada por PPAR α e PPAR γ (XU, N. *et al.*, 2006; LUO, G.; SHI; *et al.*, 2014). Contudo, Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que PPAR γ poderia estimular ou suprimir a expressão de *APOM* (LUO, G.; FENG; *et al.*, 2014). Os diferentes tipos de modelos usados (*in vivo* ou *in vitro*) podem explicar as conclusões controversas sobre a regulação da *APOM* pelo PPAR γ nesses estudos (CHENG; ZHENG, 2021).

A leptina e a insulina parecem ser os dois hormônios mais importantes na regulação da expressão de *APOM*. Em humanos com hiperinsulinemia, a apoM plasmática é reduzida em ~10% (PLOMGAARD *et al.*, 2009; ZHANG, P. H. *et al.*, 2016), enquanto os modelos experimentais com hiperinsulinemia exibem uma redução nas concentrações de apoM de 50% (ZHANG, X. *et al.*, 2007). Além disso, Xu e colaboradores (2006) demonstraram que a estimulação de insulina de células HepG2 leva a uma regulação negativa de *APOM* dose e tempo dependente. É plausível que o efeito da insulina seja mediado pela regulação da ativação de FOXA2 (WOLFRUM *et al.*, 2003; WOLFRUM *et al.*, 2008). A insulina inibe FOXA2 por meio de um mecanismo que envolve a fosforilação da treonina na posição de aminoácido Thr-156 e exclusão nuclear em modelos de roedores hiperinsulinêmicos (WOLFRUM *et al.*, 2004), através da via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase – (PI3K)/Akt (WOLFRUM *et al.*, 2008). A leptina desempenha um papel importante no metabolismo da gordura e regulação do apetite, e camundongos com a deficiência de leptina desenvolve síndrome metabólica experimental e resistência à insulina. Esses camundongos também têm concentrações de apoM marcadamente mais baixa comparados aos controles, que é normalizado pela administração de leptina (XU, N.; NILSSON-EHLE; *et al.*, 2004). Em contraste, a estimulação de leptina em células

HepG2 *in vitro* diminuem a expressão de *APOM* (LUO, G. *et al.*, 2005). A razão para esta aparente discrepância entre os papéis *in vivo* e *in vitro* da leptina não é clara e requer mais investigação. Contudo, poderia, pelo menos até certo ponto, refletir o fato de que a leptina é um hormônio multifuncional que afeta muitos diferentes métodos metabólicos vias *in vivo*, que modula indiretamente a expressão de *APOM*. Também foi mostrado que o estrogênio é um fator importante na regulação do metabolismo lipídico. Wei e colaboradores (2017) mostraram que o receptor de estrogênio alfa (*estrogen receptor alpha* – ER- α) pode ligar-se à um sítio de ligação (-GGTCA-) localizado -1580 a -1575 pb do gene *APOM* humano para promover a atividade transcricional, resultando na regulação positiva da expressão de *APOM* pelo estrogênio (Figura 25).

Di e colaboradores (2012) sugerem que a expressão de *APOM* pode ser elevada através de ABCA1 devido ao aumento de sua expressão ativada via RXR/LXR e LRH1 não estaria envolvido neste mecanismo. É possível ABCA1 ou uma proteína alvo de ABCA1 possam se ligar a certos elementos de resposta localizados na região promotora de *APOM* para regular a expressão de *APOM* (Figura 25).

TABELA 2. REGULACÃO DA EXPRESSÃO E FUNÇÃO DE APOM

Fator regulatório	Expressão de APOM	Funções	Referências
HNF-1 α	↑	Anti-inflamatória, anti-viral	(1, 2, 3)
HNF-4 α	↑	Promoção de regeneração e mitigação de fibrose	(4)
LXR	↑ intestino; ↓ fígado	Regulação do metabolismo lipídico	(5, 6)
FOXA2	↑	Anti-inflamatório, anti-aterosclerótico	(7,8)
LRH-1	↑	Regulação do metabolismo dos ácidos biliares, metabolismo das lipoproteínas e homeostase do colesterol	(9,10)
PPAR γ	↑	Regulação da sensibilidade à insulina, manutenção da homeostase de S1P	(11,12)
LncRNA HCG11	↑	Inibição da progressão do carcinoma de laringe	(13)
ABCA1	↑	Promoção da formação do HDL	(14)
Leptina	↑ <i>in vivo</i> ; ↓ <i>in vitro</i>	Desconhecido	(15, 16, 17)
apoA1	↑	Promoção da formação do HDL	(18, 19)
apoAII	↑	<i>Turnover</i> dos triglicerídeos	(18)
VLDL/LDL	↑	Regulação do tempo de circulação das partículas VLDL/LDL	(18)
PAF	↑	Pró ou anti-inflamatório dependente do receptor S1P e do tecido	(20)
ER- α	↑	Presumivelmente associado ao metabolismo lipídico	(21)
HCV	↓	Associado com produção da hepatite C	(3)
FXR/SHP	↓	Regulação do metabolismo dos ácidos biliares	(9)
PPAR β/δ	↓	Regulação do metabolismo lipídico	(22)
LncRNA TUG1	↓	Deterioração da aterosclerose	(23)
TGF- β	↓	Pró ou anti-inflamatório dependente do receptor S1P e do tecido	(24, 25)
TGF- α	↓	Pró ou anti-inflamatório dependente do receptor S1P e do tecido	(24)
EGF	↓	Pró ou anti-inflamatório dependente do receptor S1P e do tecido	(24)
HGF	↓	Pró ou anti-inflamatório dependente do receptor S1P e do tecido	(24)
Inflamação [#]	↓	Pró ou anti-inflamatório dependente do receptor S1P e do tecido	(26)
TNF α	↓; sem efeito	Pró ou anti-inflamatório dependente do receptor S1P e do tecido	(20, 26)
IL-1 β	↓; sem efeito	Pró ou anti-inflamatório dependente do receptor S1P e do tecido	(20, 26)

IGF-1	↓	
Insulina	↓	Resistência à insulina, diminuição HDL

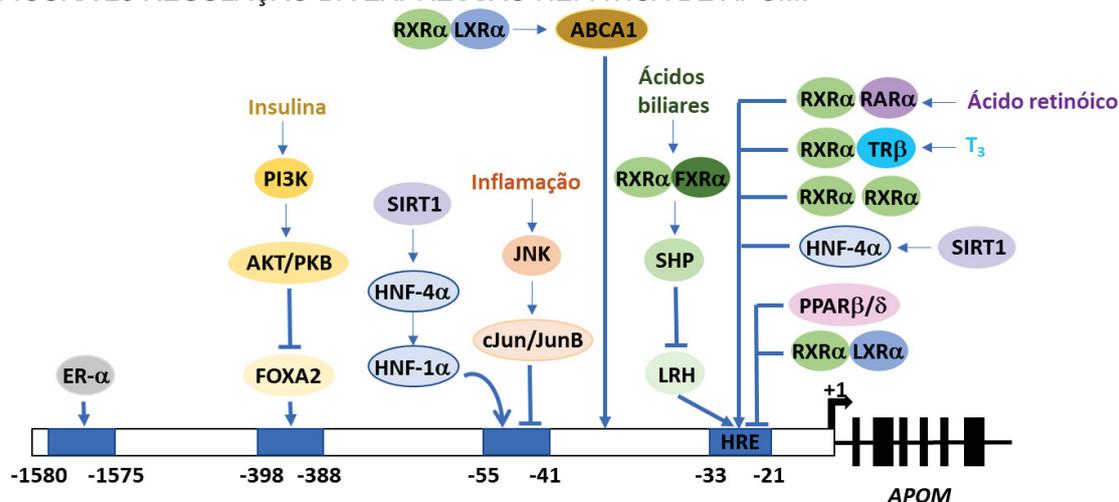
(↑) indica um nível de expressão de apoM aumentado e (↓) indica um nível de expressão de apoM diminuído. ApoM: apolipoproteína M; S1P: esfingosina 1-fosfato; HNF: fator nuclear de hepatócitos; LXR: receptor X hepático; FOXA2: do inglês *forkhead box A2*; LRH-1: receptor homólogo do fígado - 1; PPAR: receptores ativados por proliferadores de peroxissoma; lncRNA HCG11: RNA não codificante longo grupo 11 do complexo HLA; ABCA1: transportador 1 de cassete de ligação de ATP A1; apoA1: apolipoproteína A1; apoAII: apolipoproteína AII; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PAF: fator de ativação de plaquetas; ER- α : receptor de estrogênio alfa; HCV: vírus da hepatite C; FXR: receptor farnesóide X; SHP: pequeno parceiro heterodímero; lncRNA TUG1: RNA não codificante longo gene 1 regulado por taurina; TGF- β : fator de crescimento transformante beta; TGF- α : fator de crescimento transformante alfa; EGF: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; S1P: esfingosina 1 fosfato; HDL: lipoproteína de alta densidade; interleucina 1 β ; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; S1P: esfingosina 1 fosfato; HDL: lipoproteína de alta densidade.

#Estímulos que produzem inflamação sistêmica: lipopolissacarídeo (LPS), zimosan ou terebintina.

Referências: (1) (MA *et al.*, 2013); (2) (YANG; ZHAO, 2012); (3) (CAI *et al.*, 2020); (4) (DING *et al.*, 2020); (5) (CALAYIR *et al.*, 2008) (6) (ZHU, C. *et al.*, 2011) (7) (WOLFRUM *et al.*, 2008) (8) (MA *et al.*, 2015) (9) (VENTECLEF *et al.*, 2008) (10) (PAN *et al.*, 2015) (11) (LUO, G.; FENG; *et al.*, 2014) (12) (KURANO *et al.*, 2015) (13) (DI *et al.*, 2012) (14) (DI *et al.*, 2012) (15) (XU, N.; NILSSON-EHLE; *et al.*, 2004) (16) (XU, N.; NILSSON-EHLE; AHREN, 2004) (17) (LUO, G. *et al.*, 2005); (18) (KARUNA *et al.*, 2011); (19) (WOLFRUM; POY; STOFFEL, 2005); (20) (XU, N. *et al.*, 2002); (21) (WEI *et al.*, 2017) (22) (LUO, G.; SHI; *et al.*, 2014) (23) (YANG; LI, 2020) (24) (XU, N.; HURTIG; *et al.*, 2004) (25) (REN *et al.*, 2017); (26) (FEINGOLD *et al.*, 2008);

Fonte: Cheng e Zheng (2021) e Ren e colaboradores (2015).

FIGURA 25 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO HEPÁTICA DE APOM.



Os fatores regulatórios regulam os níveis de expressão de APOM direta ou indiretamente. ER- α : receptor de estrogênio alfa; FOXA2: do inglês forkhead box A2; AKT/PKB: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog ou proteína quinase B – PKB; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; HNF: fator nuclear de hepatócitos; SIRT1: sirtuina 1; cJun: Janus c; JunB: Janus B; JNK: Quinase 1 ativada por fator transformante de crescimento-beta 1; ABCA1: transportador 1 de cassete de ligação de ATP A1; RXR: receptor do retinoídeo X; LXR: receptor X hepático; LRH-1: receptor homólogo do fígado - 1; SHP: pequeno parceiro heterodímero; FXR: receptor farnesóide X; PPAR: receptores ativados por proliferadores de peroxissoma; TR: receptor de hormônio da tireoide; T₃: triiodotironina; RAR: receptor de ácido retinóico.

Fonte: Adaptado de (CHENG; ZHENG, 2021)

O conhecimento atual sobre a regulação da expressão *APOM* sugere a existência de um sistema bastante complexo com interações entre fatores de transcrição e hormônios. Quão os diferentes moduladores afetam uns aos outros precisa ser mais bem avaliado, bem como potenciais diferenças entre a apoM derivada de rim. Até o momento, nenhum conhecimento está disponível sobre os mecanismos reguladores específicos da expressão de *APOM* no rim (BISGAARD; CHRISTOFFERSEN, 2021).

Devido a localização do gene *APOM* não é de não é surpreendente que polimorfismos de nucleotídeo único no gene *APOM* estejam associados a numerosas doenças, incluindo artrite reumatoide (AR) (rs805296 e rs805297) (HU, H. J. *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2013; HUANG, Y. *et al.*, 2014), DM1 (rs805296) (WU, X. *et al.*, 2009), DM2 (rs805296) (NIU *et al.*, 2007; ZHOU, J. W. *et al.*, 2011), acidente vascular cerebral (AVC) (JIAO *et al.*, 2007; ZHAO, D. *et al.*, 2011), doença arterial coronariana (DAC) (rs805296, rs9404941 e rs1266078) (XU, N.; HURTIG; *et al.*, 2004; XU, W. W. *et al.*, 2008; ZHANG, Z.; CHU; YIN, 2013; ZHENG, L. *et al.*, 2014) e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (rs71563361,rs150863040 e rs113947529) (YU, Y. *et al.*, 2017).

aumento das concentrações de LDL e colesterol total (rs805296) (ZHANG, Z.; CHU; YIN, 2013), redução do colesterol total em mulheres chinesas e aumento do HDL em Han chinesas (rs707921) (AUNG *et al.*, 2013).

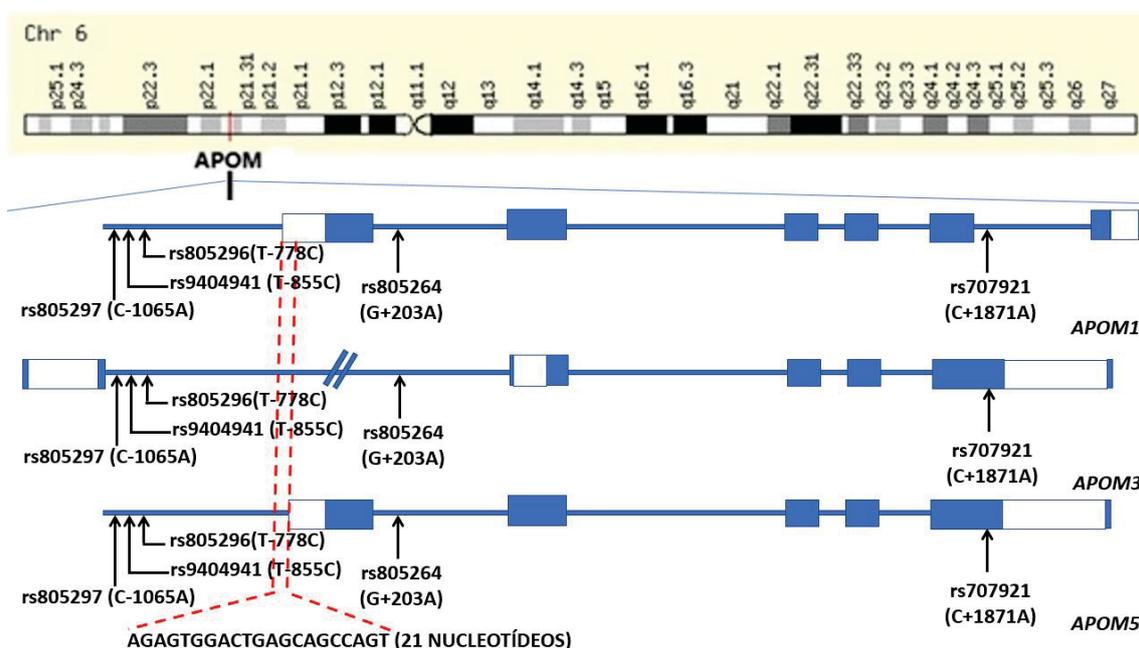
Aung e colaboradores (2013) evidenciaram a diferença da frequência dos genótipos do polimorfismo rs707921, localizado no éxon 5 do gene *APOM*, entre as populações Han e Mulao (China), onde mostraram que indivíduos Mulao, portadores do alelo A apresentavam concentrações mais altas de TG e de HDL que indivíduos Han que não apresentavam o alelo A em seu genótipo.

Du e colaboradores (2017), reportaram o completo desequilíbrio de ligação (DL) entre 3 polimorfismos do gene *APOM*, sendo eles rs805264, rs707921 e rs1266078, dos quais dois deles, são objetos desse estudo.

O gene *APOM* está localizado na região p21.31 do cromossomo humano 6, na região do complexo principal de histocompatibilidade de classe III (HLA-III), que é rica em genes envolvidos na imunidade e inflamação. O gene *APOM* é composto por 6 exons, 5 introns (DU *et al.*, 2017) (Figura 26); seu o cDNA possui 734 pb e codifica uma proteína com 188 resíduos de aminoácidos (XU, N.; DAHLBACK, 1999; PUGLIESE; EISENBARTH, 2004; AUNG *et al.*, 2013; DU *et al.*, 2017).

Três transcritos foram anotados no genoma humano (YU, Y. *et al.*, 2017). Zhou e colaboradores (2011) ao analisarem molecularmente o polimorfismo rs707922 descobriram um novo transcrito *APOM5* e a natureza críptica do exon 5 do gene, o qual é mais curto no transcrito *APOM1* em relação os transcritos *APOM3* e *APOM5*, fazendo que o polimorfismo rs707921 se localiza no intron 5 (*APOM1*) ou no intron 5 (*APOM3* e *APOM5*). Já os polimorfismos rs805297, rs9404941 e rs805296 encontram-se na região promotora nos transcritos *APOM1* e *APOM5* e no exon 1 no transcrito *APOM3* (Figura 26). O transcrito *APOM5* compartilhou o perfil de expressão no fígado e rim do transcrito mais comum (*APOM1*), mas apresenta 21 nucleotídeos a menos.

FIGURA 26. LOCALIZAÇÃO DO GENE APOM NO CROMOSSOMO 6 E AS POSIÇÕES CORRESPONDENTES DOS POLIMORFISMOS rs805297, rs9404941, rs805296, rs805264, E rs707921 NOS DIFERENTES TRANSCRITOS DO GENE APOM.



Localização do gene *APOM* no cromossomo 6, com representação esquemática da estrutura da transcrição de *APOM5* humana em comparação com os transcritos de *APOM1* e *APOM3* com as posições indicadas dos exons codificadores (blocos em azul), introns (linhas horizontais) e exons não traduzidos (blocos em branco). As flechas seguidas por linhas verticais indicam as posições correspondentes dos polimorfismos rs707921, rs805264, rs9404941 e rs805296 nos diferentes transcritos do gene *APOM*. Também indicado por linhas tracejadas (em vermelho) as estruturas do gene ressaltando a diferença da sequência de 21 nucleotídeos entre os transcritos de *APOM1* e *APOM5*.

Fonte: adaptado de Zhou *et al.*, 2011.

Devido a localização do gene *APOM* não é de não é surpreendente que polimorfismos de nucleotídeo único no gene *APOM* estejam associados a numerosas doenças, incluindo artrite reumatoide (AR) (rs805296 e rs805297) (HU, H. J. *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2013; HUANG, Y. *et al.*, 2014), DM1 (rs805296) (WU, X. *et al.*, 2009), DM2 (rs805296) (NIU *et al.*, 2007; ZHOU, J. W. *et al.*, 2011), acidente vascular cerebral (AVC) (JIAO *et al.*, 2007; ZHAO, D. *et al.*, 2011), doença arterial coronariana (DAC) (rs805296, rs9404941 e rs1266078) (XU, N.; HURTIG; *et al.*, 2004; XU, W. W. *et al.*, 2008; ZHANG, Z.; CHU; YIN, 2013; ZHENG, L. *et al.*, 2014) e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (rs71563361, rs150863040 e rs113947529) (YU, Y. *et al.*, 2017).

Aung e colaboradores (2013) evidenciaram a diferença da frequência dos genótipos do polimorfismo rs707921 entre as populações Han e Mulao (China) e indivíduos Mulao, portadores do alelo A apresentaram concentrações mais elevadas de TG e de HDL que indivíduos Han que não apresentavam o alelo A em seu genótipo.

Du e colaboradores (2017), reportaram o completo desequilíbrio de ligação (DL) entre três polimorfismos do gene *APOM*, rs805264, rs707921 e rs1266078, sendo os dois primeiros objeto desse estudo.

2.3.5 Gene Hepatocyte nuclear factor 1-alpha

O fator nuclear dos hepatócitos 1 α (HNF1 α), um fator de transcrição que está presente na superfamília do homeodomínio, é expresso no fígado, rim, intestino e pâncreas (incluindo células β) (YAMAGATA, 2014). A tabela 3 traz informações mais detalhadas sobre a função do HNF1 α em diferentes tecidos.

É também o regulador da transcrição da enzima 2 de conversão da angiotensina, que pode estar envolvida no metabolismo mitocondrial (SHI *et al.*, 2018). Além disso, o HNF1 α é o regulador transcricional dos transportadores dos ácidos biliares no intestino e rins, portanto, é importante no metabolismo de HDL (SHIH; BUSSEN; *et al.*, 2001). HNF1 α ajuda a promover a expressão do transportador de cátions orgânicos (*organic cation transporter 1* -OCT1) no fígado, que é responsável pela captação hepática de moléculas pequenas, hidrofílicas, orgânicas carregadas positivamente (KOESELL; LIPS; VOLK, 2007). Variações genéticas no HNF1 α podem mudar a expressão de OCT1 e afeta a captação hepática e o metabolismo droga que são substratos do OCT1, como metformina, tropisetrom, ondansetron, tramadol e morfina (SHU *et al.*, 2007; TZVETKOV *et al.*, 2012; O'BRIEN *et al.*, 2013)

HNF1 α regula diretamente a expressão do co-transportador de glicose de baixa afinidade/alta capacidade (sGLT2) que é responsável pela reabsorção renal de glicose (PONTOGLIO, 2000).

HNF1 α regula também a transcrição de proteínas de fase aguda envolvidas na inflamação, como fibrinogênio, proteína C reativa (PCR), e receptor de interleucina. Concentrações significativamente mais baixas de proteína HNF1 α foram observados em tumores pancreáticos e adenomas

hepatocelulares do que em tecidos adjacentes normais (BLUTEAU *et al.*, 2002; LUO, Z. *et al.*, 2015), então HNF-1 α pode ser uma proteína supressora de tumor também.

HNF1 α se liga a pelo menos 222 genes alvo no fígado humano e pelo menos 106 genes-alvo em ilhotas pancreáticas humanas (ODOM *et al.*, 2004). O desenvolvimento e função do fígado adulto, ilhotas pancreáticas ou rim é não regulado por HNF1 α apenas. HNF1 α é co-expresso com outros fatores de transcrição, por exemplo HNF1 β , HNF4 α e HNF6 (STOFFERS *et al.*, 1997; SHIH; STOFFEL, 2001; NAMMO *et al.*, 2008; DE VAS *et al.*, 2015). Junto com o fator nuclear de hepatócitos 3 (*hepatocyte nuclear factor 3* - HNF3), eles constituem uma rede funcional que regula a expressão de diferentes genes de tecido que contêm promotor ou acentuassomo (*enhancesome*, *enhancer* em inglês) para esses HNFs (SHIH; SCREENAN; *et al.*, 2001; COSTA, R. H. *et al.*, 2003; JACQUEMIN; LEMAIGRE; ROUSSEAU, 2003; LAU *et al.*, 2018). No pâncreas e no fígado, HNF1 α e HNF4 α fazem alça transcricional, ou seja, ativam a transcrição um do outro (Kuo *et al.* 1992; Kritis *et al.* 1993; Bulla e Fournier 1994; Gragnoli *et al.* 1997; Godart *et al.* 2000; Li *et al.* 2000; Wang *et al.* 2000; Eeckhoute *et al.* 2004). A haploinsuficiência de HNF1 α ou de HNF4 α altera cascata transcricional biestável (FERRER, 2002). A hierarquia de transcrição em células B tem propriedades únicas uma vez que as mutações HNF1A podem causar disfunção das células B enquanto os outros tecidos que expressam HNF1A não são danificados (BYRNE *et al.*, 1996; FROGUEL; VELHO, 1999).

TABELA 3. PROCESSOS BIOLÓGICOS DE *HNF1A* EM CERTOS TECIDOS HUMANOS

Tecido	Efeito	Referência
Pâncreas	Metabolismo de glicose	(1)
	Diabetes	
	Síntese GLUT1 e GLUT2	
	Síntese proteína quinase L	(2)
	Síntese insulina	
	Atividade promotora da insulina	
	Sensoriamento de glicose e leucina pelas células β	
	Produção pós-prandial de glicose	
	Transferência de íons de cálcio	
Intestino	Desenvolvimento e crescimento das células intestinais	(3, 4)
	Síntese dos transportadores de sais biliares	(5)

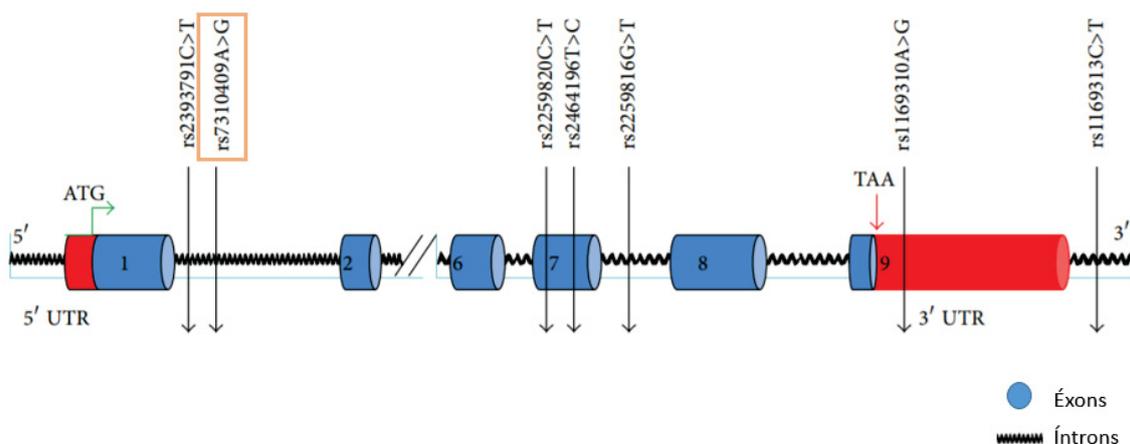
Fígado	Gliconeogênese	(6)
	Síntese e estocagem de carboidratos	
	Síntese de colesterol	
	Síntese de apolipoproteínas (apoM)	
	Síntese de monooxigenases CYP450	
	Síntese de proteínas plasmáticas	
	Transporte hepático de cátions orgânicos	(7)
Rins	Reabsorção de glicose	(8)

Referências: (1) (LUNI; MARTH; DOYLE, 2012); (2) (VESTERHUS *et al.*, 2008); (3) (D'ANGELO *et al.*, 2010); (4) (LUSSIER *et al.*, 2010); (5) (SHIH; BUSSEN; *et al.*, 2001); (6) (ODOM *et al.*, 2004); (7) (O'BRIEN *et al.*, 2013); (8) (PONTOGLIO, 2000).

Fonte: Adaptado de Valkovicova e colaboradores (2019)

O gene *HNF1A* está localizado no cromossomo 12q24 e possui 9 exons e 8 introns (FIGURA 27) (BACH *et al.*, 1990; SZPIRER *et al.*, 1994; SCHERER *et al.*, 2006). Três isoformas transcricionais de *HNF1A* (isoforma A, B e C) foram descritas geradas a partir do mesmo promotor por *splicing* alternativo e diferente poliadenilação. A isoforma mais longa é HNF1A A (10 exons), um pouco mais curta é HNF1A B (7 exons) e a mais curta das duas é HNF1A C (6 exons) (HARRIES, 2006; BELLANNE-CHANTELOT *et al.*, 2008). A isoforma A é principalmente transcrita nos hepatócitos, rins e pâncreas fetal e em menor proporção no pâncreas e ilhotas pancreáticas adultas. Os transcritos de *HNF1A* e *B* foram predominantes em pâncreas e ilhotas de adultos, mas em menor proporção no fígado e nos rins. O HNF1A C exibiu os níveis de expressão mais baixos em esses tecidos e foi detectado principalmente em pâncreas e ilhotas do que no fígado ou rim de adultos. Foi relatado que a isoforma *HNF1A* (A) tem 5 vezes menor atividade do que *HNF1A* (B) e *HNF1A* (C) (HARRIES, 2006). Essas descobertas apoiaram a ideia de que o processamento do mRNA resultando na expressão de múltiplas isoformas é dependente do tecido e do estágio de desenvolvimento.

FIGURA 27. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *HNF1A*



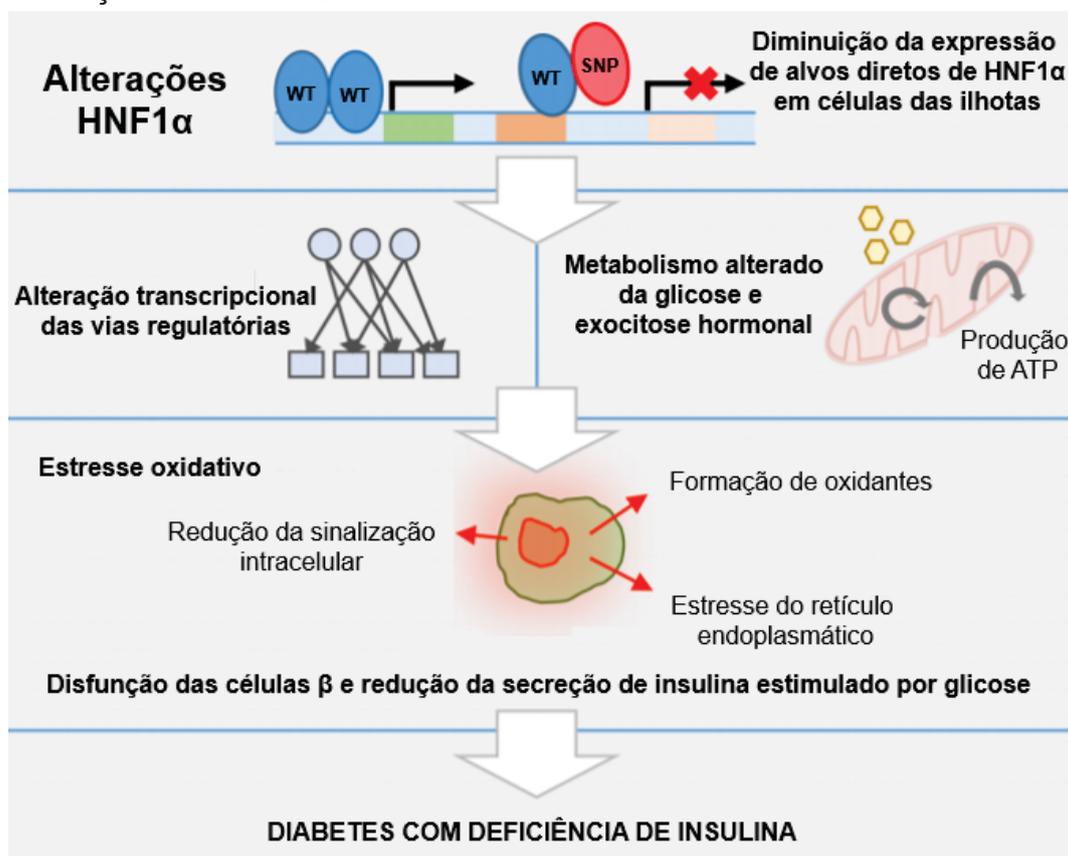
Destacado por um retângulo salmão, o rs7310409, objeto desse estudo.

Fonte: Adaptado de Wakil *et al.*, 2014.

Mutações no gene *HNF1A* podem alterar a cascata de expressão de genes regulados por HNF1 α alterando o desenvolvimento pancreático (NAQVI; HASAN; HASSAN, 2018). Secreção de insulina, a resposta secretora aos nutrientes, diminuição da proliferação das células β e estrutura anormal das ilhotas de Langerhans ocorrem quando a produção de HNF1 α é insuficiente. A detecção prejudicada da glicose pelas células β é provavelmente o resultado da redução da glicólise aeróbica e metabolismo mitocondrial (BYRNE *et al.*, 1996; DUKES *et al.*, 1998; PONTOGLIO *et al.*, 1998). A baixa concentração de ATP nas células β perturba a secreção de insulina e leva ao diabetes HNF1A-MODY (HANSEN *et al.*, 2002; VESTERHUS *et al.*, 2008). Haliyur e colaboradores (2019) propuseram um modelo para esclarecer como essas alterações que leva ao diabetes com deficiência de insulina, que ocorre não por perda significativa de massa de células β , mas por afetar as vias regulatórias da transcrição das células β que resulta no comprometimento das vias necessárias para uma resposta normal de insulina à glicose (FIGURA 28). Nos rins, o HNF1 α está envolvido na reabsorção de glicose do ultrafiltrado (PONTOGLIO, 2000). No caso de mutação no *HNF1A*, a captação é menos eficaz e a glicose permanece em concentrações mais altas na urina, apesar da glicemia normal (ou seja, causada pela redução do limiar renal para glicose). A glicosúria geralmente

precede o defeito na secreção de insulina pelas células β por vários anos (ELLARD; COLCLOUGH, 2006).

FIGURA 28. MODELO PROPOSTO DE ALTERAÇÕES DE HNF1A E DISFUNÇÕES EM CÉLULAS B HUMANAS.



Foi proposto que a disfunção de HNF1 α leva à diminuição da expressão de genes alvos diretos em células das ilhotas β pancreáticas, englobando os que codificam para produtos enzimáticos e reguladores de genes, produzindo várias mudanças na regulação da transcrição, metabolismo da glicose e secreção de hormônios, o que resulta em disfunção das células β e levam à manifestação clínica de diabetes com deficiência de insulina.

Fonte: Adaptado de Haliyur e colaboradores (2019).

HNF1A-MODY ou MODY3 é um dos mais comuns subtipos do diabetes MODY (MCDONALD; ELLARD, 2013). É um diabetes não cetótico com início durante a infância, adolescência ou início da idade adulta, caráter progressivo da hiperglicemia com alto risco de diabetes microvascular crônica complicações (ANIK *et al.*, 2015; BISHAY; GREENFIELD, 2016). O gene *HNF1A* é polimórfico e mais de 1200 variantes patogênicas e não patogênicas foram descritas em suas UTRs, exons e introns (VALKOVICOVA *et al.*, 2019). Além disso, foi observado que mutações em diferentes isoformas do gene *HNF1A* podem influenciar a idade de início da doença. Pacientes com mutações nos exons 8-

10 (afetando apenas a isoforma A) têm início tardio do fenótipo MODY3 do que os pacientes com mutações nos exons 1-6 (afetando as isoformas A, B e C) (VALKOVICOVA *et al.*, 2019). Desta forma, no diabetes HNF1A-MODY a heterogeneidade do fenótipo é típica.

Há uma relação evidente entre certas variantes de HNF1A e risco de DM2. Esta relação pode variar entre as populações. Foi demonstrada na população Mexicana associação da variante rara rs1050239 (c.1522G>A; E508K) no gene *HNF1A* com DM2 (CONSORTIUM *et al.*, 2014). Na população Oji-Cre Canadense, a variante G319S foi associada ao início precoce do DM2 (HEGELE *et al.*, 1999). Embora os polimorfismos rs1169288 (I27L) e rs1800574 (A98V) não influenciam a função das células β pancreáticas, foram associados à resistência à insulina e contrações plasmáticas de colesterol HDL (CHIU *et al.*, 2000; GAULTON *et al.*, 2015). Na verdade, estas variantes MODY3 benignas têm impacto moderado na função de HNF1 α , mas sua combinação pode prejudicar significativamente a atividade de HNF1 α na transativação (HOLMKVIST *et al.*, 2006; NAJMI *et al.*, 2017).

Prejuízo na função de HNF1 α está envolvida, além do diabetes *mellitus*, em uma variedade de outras complicações. Uma variante interagência, o rs2650000, próximo ao gene *HNF1A*, foi capaz de influenciar as concentrações plasmáticas de LDL-C e PCR (KATHIRESAN *et al.*, 2009; SABATTI *et al.*, 2009). A região promotora do gene que codifica a proteína C possui um sítio de ligação para HNF1 α e a interrupção deste promotor leva a trombofilia hereditária, uma predisposição de formação inadequada de coágulos (BERG *et al.*, 1994). Também foi mostrado que HNF1 α é necessário e suficiente para a expressão de vários genes na via de fucosilação, indicando que pode ser o principal regulador mestre da fucosilação proteica (JUSZCZAK *et al.*, 2019). Entre os diferentes papéis importantes para glicanos fucosilados, encontram-se início de uma resposta inflamatória e resposta imune aguda na infecção (LUHN *et al.*, 2001; GORNIK; LAUC, 2008; JUSZCZAK *et al.*, 2019).

Estudos de associação ampla do genoma (*Genome Wide Association Studies* - GWAS) ligaram o gene *HNF1A* com 19 diferentes doenças humanas ou características bioquímicas, tais como concentrações plasmáticas de proteína C reativa, colesterol total, LDL-C, resposta aguda à insulina, resposta à pico de insulina, DM2, carcinoma pancreático, concentrações de urato, atividade de

gama-glutamil transferase sérica (γ -GT), N-glicano, alfa-1-antitripsina sérica, homocisteína, doença arterial coronária (DAC), angioplastia coronária transluminal percutânea, *bypass* da artéria coronária, cardiomiopatia isquêmica, infarto do miocárdio e angina de peito (MACARTHUR *et al.*, 2017).

Um dos polimorfismos desse estudo é o rs7310409 (FIGURA 27), localizado no primeiro intron do gene *HNF1A*, em outros estudos já associado ao risco aumentado de uma forma severa de DAC em chineses (LIU, R. *et al.*, 2014), à altas concentrações séricas de PCR em mulheres (RIDKER *et al.*, 2008) e ao DM2 (HEGELE *et al.*, 2000), não havendo estudos publicados buscando associações ao DM1 ou função atribuída à esse polimorfismo.

Uma vez que o gene *HNFA* regula a atividade de vários genes que têm papéis na imunidade, inflamação, coagulação, metabolismo de lipídios e carboidratos (Tabela 3), suporta a possibilidade destas conexões entre estas redes metabólicas e inflamatórias possam ser tanto de natureza fisiopatológica quanto ter importância clínica para o DM1. Além disso, ainda é um desafio diferenciar MODY3 de DM1 devido suas características clínicas sobrepostas (FU *et al.*, 2019), o que apresenta relevância, uma vez que interpretação precisa do efeito patológico das variações genéticas identificadas nos pacientes é crucial para desenvolvimento de sistemas diagnósticos eficazes, tratamento, aconselhamento genético para os familiares e tomada de precauções com relação às complicações que possam se desenvolver posteriormente (URAKAMI, 2019).

Vários biomarcadores para *HNF1A*-MODY foram considerados para apoiar a seleção de pacientes para o teste genético. Entre eles, Proteína C reativa ultra sensível (PCR-us), peptídeo C e autoanticorpos de ilhotas, não forneceram boa discriminação entre o DM1 e o MODY (OWEN *et al.*, 2010; MCDONALD *et al.*, 2011; THANABALASINGHAM *et al.*, 2011; THANABALASINGHAM *et al.*, 2012). Entre as limitações da PCR-us são as concentrações elevadas durante a infecção (ORAM *et al.*, 2014) e polimorfismos no gene *HNFA* associados a baixas concentrações plasmáticas de PCR, rs1169288 (I27L), rs1169286 (c.326 +2159T>C), rs2464196 (S486N), rs1169303 (c.1502-695A> C) e rs1169310 (c.*438G> A) (REINER *et al.*, 2008). O peptídeo C pode ser detectável no início do DM1, e mesmo em 8% dos pacientes com DM1 de longa duração o que torna a distinção entre MODY e T1D mais difícil

(ORAM *et al.*, 2014). Alguns indivíduos com HNF1A-MODY possuem positividade para autoanticorpos de células β e também foi descrito cetoacidose diabética (PRUHOVA *et al.*, 2013; LEBENTHAL *et al.*, 2018). Foi sugerido que apoM é um discriminador entre HNF1A-MODY e DM1, mas não T2D (MUGHAL *et al.*, 2013). A dosagem de apoM pode ter um papel útil, particularmente nos primeiros 3-5 anos após o diagnóstico, quando a secreção de insulina endógena ainda pode ser detectada em indivíduos com DM1 (MUGHAL *et al.*, 2013).

Em síntese, fica evidenciado como a incorporação de informações clínicas às análises celulares e moleculares torna evidente que o aparente DM1, na verdade é parte de um espectro mais amplo de pessoas com diabetes e deficiência de insulina, fornecendo uma visão mais abrangente de uma forma de diabetes ainda não completamente entendida (HALIYUR *et al.*, 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde/SCS e aprovado sob o Protocolo CEP-HC Nº 071. EXT.025/2003-02.

3.1 AMOSTRAS

As amostras biológicas de 164 crianças portadoras de DM1 foram obtidas durante os exames de rotina, conforme o protocolo do serviço de atendimento aos pacientes do laboratório de Análises Clínicas do HC (Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFPR- UEP), não sendo necessária coleta específica para este projeto. As amostras de 168 crianças pertencentes ao grupo controle saudável, sem diabetes, foram obtidas de voluntários de escolas municipais da região metropolitana de Curitiba, após consentimento livre e esclarecido.

Os participantes acima de 12 anos, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CAAE: 24676613.6.0000.0102). Nos casos em que os pacientes

tinham menos de 12 anos, o termo de consentimento foi assinado pelos pais ou responsável legal.

Após a coleta de sangue os tubos com gel separador (BD Vacutainer® SST™; Becton, Dickinson, Co.), foram centrifugados (*Hermle Z206A*) por 10 minutos a 6.000 rotações por minuto (rpm). Os tubos contendo o anticoagulante EDTAK₂ (BD Vacutainer® K₂EDTA; Becton, Dickinson, Co.) foram homogeneizados por 15 minutos e retirado de alíquota (~1,0 mL) para posterior quantificação de hemoglobina glicada (HbA1c). Após, os tubos com EDTA foram centrifugados (*Hermle Z326K*) e o creme leucocitário (*buffy coat*) foi estocado para extração do DNA. Alíquotas de soro (~1,5 mL) foram estocadas em freezer -20 e -80°C. As amostras fazem parte do Biorrepositório do Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR, homologado pela Portaria N° 2.201, de 14 de setembro de 2011. Amostras hemolisadas, lipêmicas e ictéricas foram excluídas das análises.

3.1.1 Critérios para a caracterização da amostra

O projeto é um estudo tipo caso-controle com uma amostra da população brasileira. Os dois grupos em estudo foram caracterizados com os critérios:

- A) Grupo Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1): os critérios para diagnóstico do DM1 foram aqueles preconizados pela *American Diabetes Association* (ADA, 2015) e ISPAD (*International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes*) (CRAIG *et al.*, 2014).
- B) Grupo controle (CTRL - crianças saudáveis), considerando a glicemia em jejum <100 mg/dL, ausência de sintomas clínicos ou quaisquer outras patologias conhecidas reportadas pelo voluntário de pesquisa ou seu guardião legal.

Os grupos em estudo foram pareados por gênero. Os dados antropométricos e clínicos dos pacientes foram obtidos nos prontuários do Serviço do Hospital de Clínicas e pela entrevista do pesquisador. O z-score foi obtido com o calculador do *The Children's Hospital of Philadelphia* (<http://zscore.research.chop.edu/>).

3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi extraído a partir do sangue total (Vacuette EDTAK3, Greiner) pelo método de *salting out* de Lahiri e Nurnberger adaptado (1991).

A quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria em 260 e 280nm, sendo critério de exclusão amostras com concentração inferior a 20ng/ μ L ou grau de pureza (razão $A_{260/280}$) menor que 1,5 ou superior a 2,1, o que caracteriza contaminação e baixa qualidade da amostra. As amostras de DNA foram diluídas à concentração final de 20ng/ μ L com água ultrapura estéril para análises de genotipagem e armazenadas em *freezer* -20°C.

3.3 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

As determinações de parâmetros bioquímicos foram realizadas em sistema automatizado Labmax 400 (Labtest Diagnóstica SA) utilizando reagentes, calibradores e controles adequados ao sistema automatizado.

Amostras coletadas em tudo com gel separador foram centrifugadas por 10 minutos a 6000rpm, após a centrifugação, alíquotas de 1,5mL e estocadas em freezer -20 e -80°C (biorrepositório).

As amostras coletadas em tubos contendo EDTA inicialmente foram homogeneizadas por 15 minutos para posterior análise de hemoglobina glicada (HbA1c), após a reitrada dessa alíquota, foram processadas da mesma maneira que as amostras de soro.

Antes das análises, todas as alíquotas foram homogeneizadas por 30 minutos. Amostras hemolisadas, lipemicas e ictéricas foram excluídas de todos os ensaios.

As determinações de parâmetros bioquímicos foram realizadas em sistema automatizado Labmax 400 (Labtest Diagnóstica SA) utilizando reagentes, calibradores e controles adequados ao sistema automatizado.

A concentração plasmática de APOM foi quantificada por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) utilizando reagentes, calibradores e controles comerciais (Elabscience® ELISA Test Kits - Elabscience® INC, Cat E-EL-H0473, Wuhan, China). Para o ensaio, foram utilizados 50 μ L de soro e o procedimento foi realizado conforme orientações contida no protocolo do Kit. A leitura das

placas foi realizada no equipamento GloMax[®]-Multi+ (Promega Biotecnologica do Brasil, Ltda).

As determinações do ensaio para quantificação da MMP9, foram realizadas com tecnologia Luminex (xMAP[®] Technology, Merck KGaA, Darmstadt- German), utilizando de kits comerciais (Milliplex MAP Human MMP Panel 2 Magnetic Bead Kit – 96 - Well Plate Assay, Cat HMMP2MAG-55K) através reagentes, controles, insumos e protocolo recomendados pelo fabricante.

3.4 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

As genotipagens dos polimorfismos apresentados na Tabela 4 foram realizadas através da técnica de PCR em tempo real utilizando sondas fluorescentes específicas do sistema TaqMan[®] (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

TABELA 4 - CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO.

GENE	DESIGNAÇÃO GENE: OMIN	POSIÇÃO CROMOSSÔMICA	REGIÃO DO GENE	POLIMORFISMOS		ASSAY ID
SOD2	147460	Chr.6: 159692840	Exon 2	rs4880	T>C	C__8709053_10
BACH2	605394	Chr.6:90247744	Intron 2	rs3757247	C>T	C__27475051_10
MMP9	120361	Chr .20:46011586	Exon 6	rs17576	G>T	C__11655953_10
APOC3	107720	Chr.11: 116832924	Exon 4	rs5128	C>G	C__8907537_1_
		Chr.11:116829268	Promotor	rs2542052	C>A	C__12081488_20
HNF1 α	142410	Chr.12: 120987058	Intron 1	rs7310409	G>A	C__26991788_10
APOM	606907	Chr6:31657764	Exon 5	rs707921	C>A	C__7514754_10
		Chr6:31656096	Promotor	rs805264	G>A	C__7514753_10

rs: *reference sequence* (sequência de referência do SNP); OMIN: *Online Mendelian Inheritance in Man*[®]; ASSAY ID: sonda específica para determinado polimorfismo.

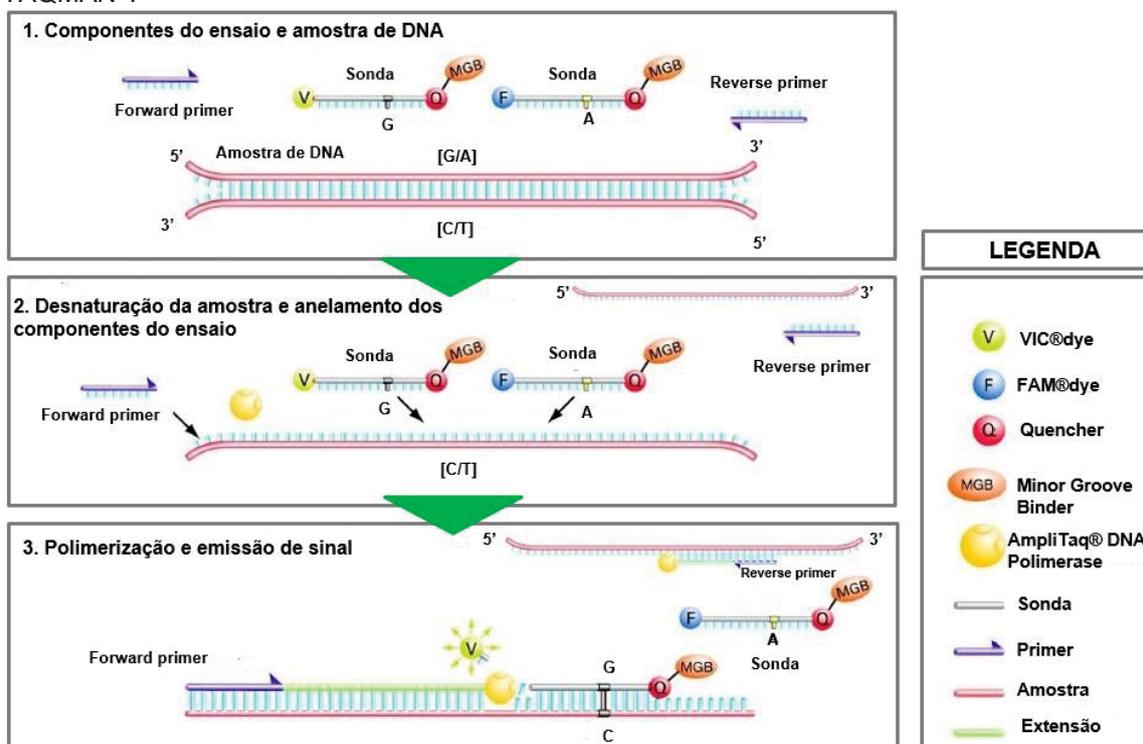
FONTE: NCBI, 2018; OMIM, 2018.

Essa técnica é utilizada para amplificar sequências alvo e simultaneamente gerar um sinal do genótipo e discriminação alélica de forma fácil, rápida e eficiente (MEIJERMAN *et al.*, 2007).

O sistema TaqMan[®] utiliza dois *primers* específicos (*forward* e *reverse*) com objetivo de amplificar a região polimórfica em estudo. A técnica consiste em uma reação a qual deve conter o DNA genômico, *TaqMan[®] Genotyping Master Mix*, *primers forward* e *reverse* e duas sondas TaqMan[®] MGB. Na presença do polimorfismo de interesse, cada sonda reconhece especificamente uma sequência complementar, localizada entre os *primers*. Enquanto não há clivagem da sonda, a proximidade do corante supressor (*quencher*) ao corante repórter suprime sua fluorescência.

A atividade de exonuclease da AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase cliva apenas as sondas hibridizadas com o alvo. Através da clivagem enzimática, ocorre a separação do corante repórter do *quencher*, aumentando a fluorescência do repórter. O aumento da fluorescência ocorre apenas se a sequência alvo amplificada for complementar à sonda. Assim, o sinal de fluorescência gerado pela amplificação por PCR indica quais alelos estão na amostra, conforme ilustrado na figura 29.

FIGURA 29 - PRINCÍPIO DA PCR EM TEMPO REAL COM SONDA FLUORESCENTES TAQMAN[®].



1. Componentes do ensaio e amostra de DNA: os primers (oligonucleotídeos iniciadores) forward e reverse usados para amplificar a sequência polimórfica de interesse e duas sondas marcadas com fluoróforos (VIC e FAM) na extremidade 5' para a detecção específica do alelo. A fluorescência é bloqueada pelo quencher na extremidade 3', acoplado a um agente estabilizador, o Minor Groove Binder (MGB), com função de estabilizar o complexo sonda/DNA molde. 2. Desnaturação da fita dupla de DNA molde e anelamento dos componentes do ensaio. 3.

Polimerização e emissão do sinal fluorescente: a Taq DNA polimerase inicia a síntese de uma nova fita de DNA e encontra a sonda; o sinal fluorescente ligado a extremidade 5' da sonda é clivado e um sinal de fluorescência é emitido, podendo ser detectada pelo equipamento.

FONTE: Adaptado de (MAYO *et al.*, 2010).

Os ensaios foram realizados no equipamento 7500 Fast™ (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), usados reagentes (*Master Mix®*, *SNP Genotyping Assay®*) e demais suplementos fornecidos pelo fabricante (*Applied Biosystems*).

As reações seguiram o protocolo descrito na Tabela 5, realizadas em placas de 96 poços, dentro da câmara de fluxo laminar. A placa foi coberta com filme adesivo específico e posteriormente centrifugada (*Hermle Z326K*) por 2 minutos a 4.000 rpm para remoção de possíveis bolhas e sedimentação da mistura com o DNA.

TABELA 5 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

REAGENTES	VOLUME (8µL)
<i>Master Mix®*</i>	3,0 µL
SNP <i>Genotyping Assay®</i>	0,1 µL
Água ultra-pura	1,9 µL
DNA molde (20ng/µL)	3,0 µL
CICLAGEM	TEMPERATURA → TEMPO
1 ciclo	60°C → 30 s (pré-PCR)
1 ciclo	95°C → 60 s (ativação polimerase)
50 ciclos	[95°C → 15 s (desnaturação)
1 ciclo pós-PCR	60°C → 30 s

Master Mix®: sistema de reação composto pela Taq DNA polimerase, Mg⁺⁺, tampão e ativadores, otimizado para uso com sondas TaqMan®. *SNP Genotyping Assay®*, sondas fluorescentes específicas para genotipagem com os fluoróforos VIC e FAM.

FONTE: O autor, 2018.

Em cada placa foram utilizados dois poços como controle negativo, contendo apenas o *Super Master Mix*, para avaliar possível contaminação do sistema. As amostras do grupo controle e diabéticas foram inseridas nas placas de maneira aleatória, seguindo mapa de trabalho previamente elaborado. Para todas as análises, a qualidade da genotipagem foi superior a 98% identificada pelo *software* do sistema 7500 Fast™.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis contínuas foram analisadas para normalidade com o teste de *Kolmogorov-Smirnov* e a presença de *outliers* foi realizada pelo método gráfico

disponível no programa *Statistica* para *windows* 10.0 (*StatSoft Inc, Tulsa OK, USA*).

Para as variáveis descontínuas foram utilizados os testes de *Chi-quadrado* (χ^2), para as análises de correlação, o modelo descrito por *Pearson* (correlação linear).

As variáveis contínuas com distribuição normal foram comparadas pelo teste “t” de *Student* bidirecional para amostras não pareadas. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram “normalizadas” por transformação logarítmica ou analisadas pelo teste *U* de *Mann-Whitney*, conforme apropriado. As variáveis com distribuição normal foram representadas pela média $\pm 1SD$ e as sem distribuição normal pela mediana (intervalo interquartil, 25%-75%).

Para os ensaios de correlação e associação utilizando ANOVA, os polimorfismos em estudo foram codificados como 1 (homozigoto usual), 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto raro).

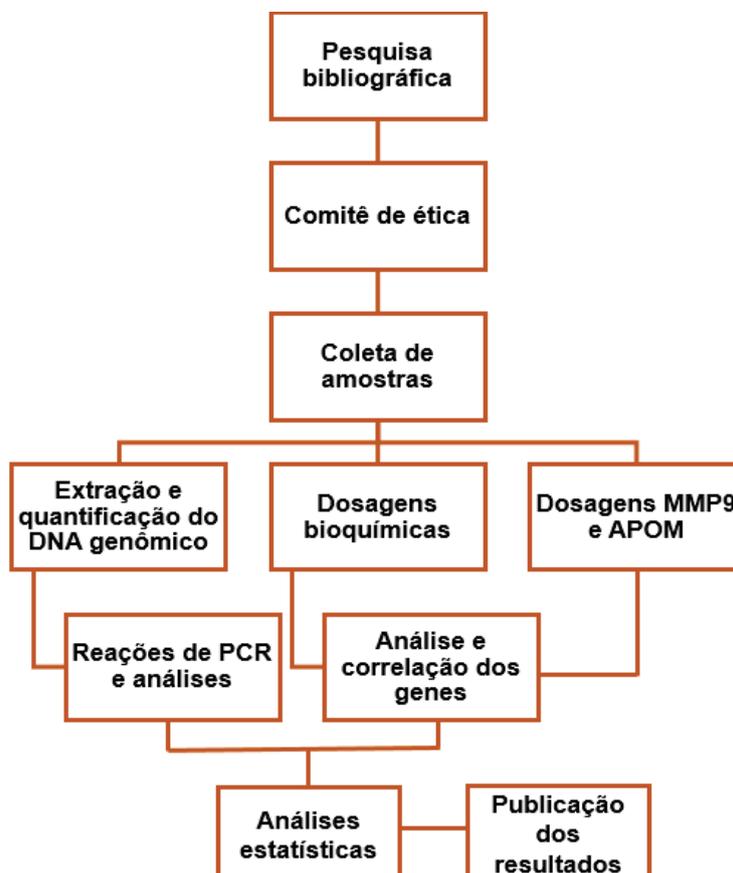
A verificação do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, cálculos das frequências genotípicas e alélicas, bem como o intervalo de confiança de 95% (IC95%) para os alelos de menor frequência (*MORARIU-ZAMFIR et al.*) foram realizados com o programa *DeFinetti* (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Para as comparações das frequências alélicas com outras populações, foi considerado similar quando o dentro do limite de 95% do intervalo de confiança. Frequências acima ou abaixo do 95%IC foram consideradas diferentes. Uma probabilidade inferior a 5% ($P < 0,05$) foi considerada significativa em todas as análises.

3.6 FLUXOGRAMA DE TRABALHO

O fluxograma de trabalho, evidenciando as principais etapas do projeto, está ilustrado na Figura 30.

FIGURA 30 – FLUXOGRAMA DE TRABALHO.



FONTE: O autor, 2021.

Após coletadas, as amostras foram processadas as amostras e realizadas as dosagens bioquímicas e genéticas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os resultados das análises descritivas dos dados antropométricos dos grupos (DM1 e CONTRLE) estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6. CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E CLÍNICA DOS GRUPOS DM1 E CRIANÇAS-CONTROLE UTILIZADAS NO ESTUDO.

PARÂMETROS	CONTROLE (n=168)	DM1 (n=164)	P
Idade (anos)	10,0 (10,0–11,0)	11,0 (9,0–13,0)	<0,001
Meninos/meninas, n	91/77	78/86	0,345
Peso (kg)	40,4 (33,2–45,2)	38,7 (30,0–50,5)	0,930
Altura (m)	1,4 (1,3–1,5)	1,4 (1,3–1,5)	0,935*
IMC (kg/m ²)	19,5 ± 4,4	18,7 ± 3,0	0,334*
Z-score ¹	0,5 ± 1,0	0,2 ± 0,9	<0,001*
Idade de diagnóstico DM1	-	6,6 (4,0–9,0)	-
Tempo de DM	ND	4,0(2,0-7,0)	-
CAD no diagnóstico (%)	ND	69,5	-
CAD no último ano (%)	ND	27,4	-
Histórico familiar para diabetes (%)	ND	64,5	-

IMC: Índice de Massa Corporal. ND: dado não disponível. CAD: cetoacidose diabética.

Os valores são média±Desvio Padrão para variáveis com distribuição normal, mediana (intervalo interquartil) para variáveis sem distribuição normal. P: probabilidade teste U de Mann-Whitney; *P: probabilidade teste t-Student. P<0,05 é significativo.

FONTE: O autor, 2016.

Idade e gênero

Ambos os grupos foram pareados por gênero e os resultados mostram que houve diferença estatística significativa entre os grupos nos parâmetros Z-score e idade. Os pacientes analisados apresentaram idade ao diagnóstico de 1,9 a 7,9 anos. Esses valores estão abaixo do descrito na população polonesa que apresentou em estudo multicêntrico uma média de idade de diagnóstico, de 9,2 ± 4,5 (em anos) (SZYPOWSKA *et al.*, 2017), e acima do encontrados em um estudo israelense de com crianças DM1, em que os pacientes estudados apresentaram idade média de 5,4 anos (NIMRI; PHILLIP; SHALITIN, 2007), mas semelhantes ao estudo de população portuguesa que apresentou idade média de diagnóstico de 6,6 anos (SALES LUIS *et al.*, 2019). Muitos estudos revelam uma variação pronunciada da tendência da incidência de DM1 com a idade. O DM1 na infância tem uma incidência aumentada com a idade e atinge seu pico entre 10 à 14 anos de idade (XIA *et al.*, 2019), com apenas limitada inconsistência de estudos (WOJCIK *et al.*, 2015; FERNANDEZ-RAMOS *et al.*, 2017; SHALTOUT *et al.*, 2017) relatando uma incidência entre 5 à 9 anos de idade. Por outro lado, a incidência de DM1 diminui após os 14 anos de idade, e

¹ O número de desvio padrão (DP) distante da média, quando a distribuição é normal (WANG, Y.; CHEN, H, Use of Percentiles and Z -Scores in Anthropometry, In: PREEDY, V, R, **Handbook of Anthropometry: Physical Measures of Human Form in Health and Disease**, 2012, p,3107,

tal tendência de declínio persiste na idade adulta (DIAZ-VALENCIA; BOUGNERES; VALLERON, 2015).

O grupo com DM1 apresentou menor escore Z, índice que congrega informações como peso, idade e estatura (DIBLEY *et al.*, 1987) quando comparado ao grupo controle ($P < 0.001$), característica de crianças com DM1 (ADA, 2021).

Histórico familiar

Esse estudo, encontrou entre os indivíduos diagnosticados com DM1, um histórico familiar de diabetes (1 ou 2) de 64,5%. Ainda não foi descrito um padrão de herança relacionado ao DM1 (PRIMAVERA; GIANNINI; CHIARELLI, 2020), no entanto foi relatado que a predisposição genética pode explicar até 50% do risco (CEROLSALETTI; HAO; GREENBAUM, 2019). Além disso, indivíduos com familiares diagnosticados com DM1, têm maior risco de desenvolver a mesma doença (cerca de 15-20 vezes), uma vez que o risco é cerca de 0,4% na população geral (POCIOT; LERNMARK, 2016; REDONDO; STECK; PUGLIESE, 2018). Em gêmeos a taxa de concordância para o DM1 é de 25-50% em univitelinos e 6-7% em dizigóticos (METCALFE *et al.*, 2001; POCOT; LERNMARK, 2016).

Cetoacidose diabética (CAD)

No presente estudo, cerca de 69% das crianças com DM1 entrevistadas relataram episódio de cetoacidose no momento do diagnóstico, um número bem elevado quando comparado com países Europeus, como Suécia (16-19%) (HANAS; LINDGREN; LINDBLAD, 2007; CHERUBINI *et al.*, 2020), Alemanha (20%) (SEGERER *et al.*, 2021) e Polônia (28.6%) (SZYPOWSKA *et al.*, 2017). Dados de uma população de pacientes no Colorado (EUA) comparáveis à população alemã, mostram uma proporção de pacientes com CAD de mais de 50% (ALONSO *et al.*, 2020). Dados Italianos recentes indicaram taxas de CAD de quase 50% (RABBONE *et al.*, 2020). A taxa mais alta, quase 80%, foi encontrada na Arábia Saudita (GROSSE *et al.*, 2018). Segerer e colaboradores (2021) sugerem que as diferenças da incidência de CAD no diagnóstico do DM1 se deva ao fato que em países com maior incidência a população em geral e a comunidade médica possuem maior conhecimento da doença (sinais e sintomas

iniciais que os pacientes apresentam na manifestação do DM1) permitindo diagnóstico precoce (USHER-SMITH *et al.*, 2011), mas também pelo atendimento estruturado bem como atividades de prevenção e rastreamento (ELDING LARSSON, 2016). Mas também é concebível que a manifestação de diabetes com CAD não seja apenas a consequência de uma resposta retardada aos sintomas iniciais, mas, pelo menos, em alguns casos, a indicação de um curso especial da doença com destruição particularmente rápida de células beta, como a maior incidência e muitas vezes rápido desenvolvimento em crianças pequenas sugere. Inclusive já foi evidenciado a existência da doença com cursos particularmente agressivos entre crianças pequenas (FRITSCH *et al.*, 2013). Apesar disso, CAD não parece ser um evento fatal e inevitável, como evidenciado pelas baixas taxas na Suécia (SEGERER *et al.*, 2021).

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os resultados das dosagens dos parâmetros bioquímicos são apresentados na tabela 7.

TABELA 7. DADOS LABORATORIAIS E ANTROPOMÉTRICOS DOS GRUPOS EM ESTUDO.

PARÂMETROS	CONTROLE (n=168)	DM1 (n=164)	P
Glicemia (mg/dL)	91,0 (85,0–98,0)	253,9 (163,5–337,5)	<0,001
HbA1c (%)	5,2 (5,1–5,4)	9,7 (8,6–11,1)	<0,001
1,5 anidroglicitol (µg/mL)	31,5 (25,7–38,3)	3,5 (1,7–4,7)	<0,001
Colesterol total (mg/dL)	148,5 (128,0–168,0)	174,9 (147,0–196,0)	<0,001
HDL-colesterol (mg/dL)	50,6 (42,0–58,0)	55,1 (46,0–63,0)	<0,001
LDL-colesterol (mg/dL)	82,0 (62,2–95,4)	103,2 (83,0–118,0)	<0,001
Triglicérides (mg/dL)	100,4 (67,5–128,5)	83,3 (54,0–89,0)	<0,001
apoM (µmol/L)	2,46 ± 0,97	1,88 ± 0,74	<0,001*
Albumina (g/dL)	4,2 (4,0–4,5)	4,2 (4,0–4,4)	0,761
Proteína total (g/dL)	7,3 (6,8–7,7)	7,7 (6,9–7,5)	0,091
Creatinina (mg/dL)	0,5 (0,4–0,6)	0,7 (0,6–0,8)	<0,001
Ureia (mg/dL)	22,7 (18,0–26,0)	27,1 (22,0–31,0)	<0,001
Ácido úrico (mg/dL)	3,5 (±0,8)	3,2 (±1,1)	<0,001
MMP9 (pg/ml) ¹	64360,0 ± 37961,2	71440,0 ± 43918,1	0,246

Os valores são apresentados como média \pm DP, mediana (intervalo interquartil, 25% –75%) ou %. Controles: crianças saudáveis; DM1, crianças com DM1; Os valores P foram calculados pelo teste U de Mann-Whitney. *Teste – T (*two-tailed*), Valores de P significativos ($P < 0,05$) estão marcados em negrito.

Marcadores de controle glicêmico

A concentração dos biomarcadores de controle glicêmico foi significativamente maior no grupo DM1 (Tabela 4). Essa diferença era esperada e confirma os critérios de seleção dos grupos, em especial o grupo controle em que é esperado glicemia de jejum dentro dos parâmetros normais, mesmo a glicemia deste grupo não ter sido feita em jejum.

Glicemia em jejum >180 mg/dL, HbA1c $>7,5\%$ e 1,5-AG <10 μ g/dL, corroboram o mau controle glicêmico do grupo DM1 (VAN LEEUWEN; BLADH, 2015; SBD, 2019; ADA, 2021). A baixa concentração de 1,5 anidroglicitol (1,5AG) no grupo DM1 em relação ao controle (3,5 μ g/mL vs 31,5 μ g/mL; $P < 0,001$) sugere picos (ou excursões) glicêmicos frequentes e contínuos nos diabéticos superiores ao limiar renal (~ 180 mg/dL). O resultado da mediana de HbA1c para o grupo DM1 (9,7%) foi semelhante a média obtida para a população Brasileira (sudeste, norte/nordeste, sul e centro oeste) com 8.9 ± 4.3 anos de idade, que apresentaram um valor médio de HbA1c de $9,1 \pm 2,4\%$ (GOMES *et al.*, 2021). O mau controle glicêmico reportado neste estudo 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) (Implications of the Diabetes Control and Complications Trial. American Diabetes Association, 1993).

Uma consequência do mau controle glicêmico são as complicações microvasculares e macrovasculares (NAJEM *et al.*, 2021) e vários são os fatores que podem contribuir para isso, como a falta de apoio familiar, a não participação de programas de educação sobre diabetes, além das desigualdades socioeconômicas (KIM, H. *et al.*, 2012; MALERBI *et al.*, 2012; DAVISON *et al.*, 2014; VAN DUINKERKEN *et al.*, 2014; GOMES; NEGRATO, 2016).

Perfil lipídico

Hiperglicemia e dislipidemia são anormalidades metabólicas comumente encontradas em indivíduos com DM1 (MAAHS *et al.*, 2013), sendo que a presença de dislipidemia aumenta significativamente a possibilidade de desenvolver doenças cardiovasculares (HOMMA *et al.*, 2015), pois pacientes com DM1 têm de 2 a 4 vezes mais risco de desenvolver aterosclerose em comparação com pessoas sem DM1 e eventos cardiovasculares são responsáveis por até 44% da mortalidade total nos indivíduos com a doença (TOMKIN, 2008; LEMKES *et al.*, 2010; SCHNELL *et al.*, 2013).

A dislipidemia diabética é caracterizada por concentrações reduzidas de HDL-C e aumentadas do LDL-C e triglicerídeos (TGs) (SCHWAB, K. O. *et al.*, 2010) e tem alta taxa de prevalência entre os pacientes com DM1 (72,5%) quando comparados aos indivíduos saudáveis, mesmo entre os pacientes muito jovens, caracterizado principalmente por aumento das concentrações do colesterol total e LDL-C (GUY *et al.*, 2009; LEMKES *et al.*, 2010; HOMMA *et al.*, 2015).

Nesse estudo, os pacientes com DM1 apresentaram concentrações maiores de colesterol total, HDL-C e LDL-C menores de triglicerídeos, que o grupo controle. Embora as concentrações plasmáticas de LDL-C no grupo DM1 sejam superiores ao encontrado no grupo controle, permanecem dentro dos intervalos aceitáveis de risco (<2.6 mmol/L) (ADA, 2021). Embora dislipidemia seja comum em crianças com DM1 (KERSHNAR *et al.*, 2006; SCHWAB, K. O. *et al.*, 2006; GUY *et al.*, 2009; ORCHARD; COSTACOU, 2010), DM1 pode apresentar 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),

Um estudo brasileiro descreveu que a proporção de dislipidemia em pacientes com DM1 foi de 72,5%, frequentemente devido à hipercolesterolemia e menos frequentemente devido à hipergliceridemia (HOMMA *et al.*, 2015). Em contraposição, em um estudo com a população da Turquia, a taxa de dislipidemia encontrada em pacientes com DM1 foi de 30,3% (DEMIREL *et al.*, 2013).

Hábitos alimentares locais, faixa etária selecionada e diferentes intervalos de referência para dislipidemia são algumas das razões que justificam as

diferentes frequências de dislipidemia encontradas na literatura (BULUT; DEMIREL; METIN, 2017).

Apolipoproteína M

Nesse estudo a concentração de apoM foi significativamente ($P < 0,001$) menor (cerca de 23% na mediana) em crianças com DM1 quando comparada aos controles (respectivamente, 1,88 vs. 2,46 $\mu\text{mol/L}$), diferente do encontrado por Mughal e colaboradores (2013), que não encontraram diferenças entre as concentrações de apoM entre o DM1 e o grupo controle, mas encontraram valores significativamente menores para indivíduos com HNF1A-MODY em comparação com DM1 (1,37 (0,26), $p = 3,1 \times 10^{-18}$) e controles (1,34 (0,22)), $p = 7,2 \times 10^{-19}$).

A não concordância entre os estudos pode ser atribuído a uma diferença entre a idade de diagnóstico avaliada neste estudo (11,0 (9,5–13,0)) e o estudo de Mughal e colaboradores (2013) (25,5 (11,5) anos). No entanto, as concentrações plasmáticas de APOM foram 9% mais baixos em pacientes com DM2 em comparação com os controles (PLOMGAARD *et al.*, 2009).

Embora estudos anteriores tenham relatado uma associação positiva bastante forte (r 0,28 a 0,42) entre as concentrações plasmáticas de apoM e colesterol LDL (AXLER; AHNSTROM; DAHLBACK, 2007; AHNSTROM *et al.*, 2008; PLOMGAARD *et al.*, 2009) nenhuma correlação significativa foi encontrada entre apoM e o perfil lipídico neste estudo.

Axler e colaboradores (2007) também mostraram que para indivíduos saudáveis com idade ≥ 18 anos, a concentração plasmática de apoM está positivamente associada ao colesterol HDL e LDL. Além disso, os autores observaram que apenas para as mulheres, a concentração de apoM foi positivamente correlacionada com a idade ($r = 0,24$, $p < 0,001$). Desse modo, não foi possível estabelecer um intervalo de referência comum para toda a população, o que poderia explicar a variação da concentração de apoM encontrada na literatura (0,91 \pm 0,22 1,37 \pm 0,33 $\mu\text{mol/L}$) para indivíduos adultos saudáveis (AXLER; AHNSTROM; DAHLBACK, 2007; AHNSTROM *et al.*, 2008; PLOMGAARD *et al.*, 2009; AHNSTROM *et al.*, 2010).

Além disso, foi relatado que as concentrações de apoM são aproximadamente 30% maiores no soro do que no plasma (AHNSTROM *et al.*, 2008).

A expressão de *APOM* no fígado é regulada por estímulos inflamatórios, fatores de transcrição e hormônios (BISGAARD; CHRISTOFFERSEN, 2021) (Tabela 2). Além disso, foi relatado que polimorfismos presente na região promotora do gene *APOM* pode aumentar a atividade do promotor (WU, X. *et al.*, 2009). Portanto, a existência de um sistema bastante complexo com interações entre fatores de transcrição, hormônios e polimorfismos funcionais. Como os diferentes moduladores afetam uns aos outros precisa ser mais avaliado.

Proteínas Totais e Albumina

As concentrações das proteínas totais e albumina não mostraram diferenças significativas ($p=0,091$ e $p=0,761$, respectivamente) entre os grupos (Tabela 4). Em análise global os pacientes com DM1 não apresentam sinais de perda proteica importante ou deficiência nutricional dos indivíduos.

Creatinina e Ureia

Para os marcadores de função renal, foi observado diferença estatística entre os grupos na quantificação de creatinina, que se mostrou significativamente maior no grupo DM1 ($P<0,001$), no entanto, permanece dentro do intervalo de referência para risco em crianças (28–63 $\mu\text{mol/L}$) (CERIOTTI *et al.*, 2008).

Embora a nefropatia esteja dentre as complicações mais frequentes associadas ao DM1, sendo esta progressiva e associada ao mau controle glicêmico (DONAGHUE *et al.*, 2014), os resultados obtidos indicam que os participantes deste estudo não apresentam uma lesão renal manifesta, detectada através dos biomarcadores quantificados.

Ácido úrico

A concentração sérica de ácido úrico foi significativamente menor ($P<0,001$) no grupo DM1 ($189,8\pm 63,6$ $\mu\text{mol/L}$) quando comparado às crianças saudáveis ($211,8\pm 47,6$ $\mu\text{mol/L}$), bem como no estudo de Lytvyn e colaboradores (2015) (242 ± 55 vs. 306 ± 74 $\mu\text{mol/L}$), provavelmente devido a uma diminuição do

ácido úrico reabsorção mediada por altas concentrações de glicose no tubo lúmen dos túbulos renais.

Embora as concentrações de ambos os grupos estejam dentro do intervalo de referência, estudos evidenciaram em modelos animais e humanos que baixas concentrações plasmática de ácido úrico estão associadas a várias vias principais implicadas na patogênese das complicações do DM1, como anormalidades metabólicas (insulina resistência e hiperglicemia), doença cardiovascular (hipertensão, disfunção endotelial, rigidez arterial e disfunção diastólica cardíaca) e disfunção renal (PALMER *et al.*, 2013; BJORNSTAD *et al.*, 2014; LYTVYN; PERKINS; CHERNEY, 2015).

Metaloproteinase de matriz 9

As concentrações da MMP9 sérica encontradas foram semelhantes nos grupos ($P=0.246$) (Tabela 4), similar ao encontrado por [Stabouli, 2020 #9093] e [Derosa, 2005 #3199], mas discordante do encontrado por [Rogowicz-Frontczak, 2014 #9092], que observaram concentrações mais elevadas nos pacientes com DM1 ($P=0.01$), inclusive mais elevadas em indivíduos DM1 com microangiopatia. Woo e colaboradores [Woo, 2016 #9094] também identificaram valores aumentados de MMP9 em indivíduos DM1 após episódios de cetoacidose, sugerindo contribuição para disfunção neuronal nesses indivíduos. Contudo, também foi reportado concentrações de MMP-9 significativamente mais baixas em pacientes DM1 com anormalidades microangiopáticas em comparação aos controles e pacientes DM1 sem complicações ($P=0,024$ e $P=0,0013$, respectivamente) [Derosa, 2005 #3199],

Os achados que envolvem MMP-9 e DM são controversos, entretanto, sabe-se que em pacientes com diabetes, a hiperglicemia constante gera estresse oxidativo e a síntese de MMP-9 é induzida por hiperglicemia constante, o que foi demonstrado através da expressão e a atividade de MMP-9 aumentadas em consequência do estresse oxidativo gerado em células endoteliais vasculares [Cabral-Pacheco, 2020 #8743].

As evidências para as associações de MMPs com fatores de risco cardiovascular são bem conhecidos, reforçando o papel de estratégias preventivas para reduzir os fatores de risco modificáveis no paciente pediátrico [Stabouli, 2020 #9093].

4.3 ANÁLISES MOLECULARES

Os genótipos e frequências alélicas dos polimorfismos estudados não mostraram diferenças entre os grupos estudados ($P < 0,05$) e encontram-se no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$) em ambos os grupos. Para os alelos de menor frequência (MAF) dos polimorfismos desse estudo, os valores encontrados foram comparados às outras populações descritas no HAPMAP e na literatura.

4.3.1 GENE SUPERÓXIDO DISMUTASE 2

Estudos prévios mostram que o rs4800 desempenha um papel no desenvolvimento de DM1 (TIAN *et al.*, 2011).

Neste estudo, o polimorfismo rs4880 do gene *SOD2* não revelou associação à doença na população sul-brasileira, uma vez que não foi encontrado diferenças entre as frequências genotípicas e alélicas nos grupos DM1 e controle (Tabela 8).

TABELA 8. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO rs4880 NOS GRUPOS EM ESTUDO.

GENE POLIMORFISMO	GENÓTIPO ALELOS	CONTROLES (n = 168)	DM1 (n = 164)	P
SOD2 rs4880 A > G	A/A	40 (23.9)	37 (22.7)	0.649
	A/G	80 (47.6)	82 (49.7)	
	G/G	48 (28.5)	45 (27.6)	
	H-W (P)	0.555	0.961	0.984
	Alelo G,% [95% CI]	52.4 [47-58]	52.5 [47-58]	

Os valores são apresentados como n (%). Controles, crianças saudáveis; DM1, crianças com diabetes tipo 1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$). IC de 95%, intervalo de confiança de 95%. Probabilidade (P), teste do qui-quadrado; significativo $P < 0,05$ (em negrito).

Fonte: o autor, 2021.

Em relação à variação polimórfica rs4880, Eddaikra e colaboradores (2018) mostraram em estudo com a população da Argélia, a presença de diferença significativa apenas para o genótipo heterozigoto AG ($P = 0,040$) com risco 2,37 vezes maior de desenvolver DM1 e sugeriram, efeito protetor do genótipo GG aos indivíduos.

Até o momento, há poucos estudos que mostraram associação do polimorfismo rs4880 de SOD2 com DM1 (CHISTYAKOV *et al.*, 2001; FLEKAC *et al.*, 2008; EDDAIKRA *et al.*, 2018). A maioria dos estudos indicam que este polimorfismo impactou no desenvolvimento das complicações microvasculares (NOMIYAMA *et al.*, 2003; MOLLSTEN *et al.*, 2007; HOVNIK *et al.*, 2009) (CHISTYAKOV *et al.*, 2001; MOLLSTEN *et al.*, 2007; MOLLSTEN *et al.*, 2009; MOHAMMEDI *et al.*, 2014) e macrovasculares (MOLLSTEN *et al.*, 2009; SOUIDEN *et al.*, 2016) em pacientes com diabetes. O genótipo Val/Val do rs4880 mostrou aumentar o risco de retinopatia em pacientes com DM1; no entanto, nenhuma associação foi encontrada para nefropatia (HOVNIK *et al.*, 2009). Notavelmente, estudos realizados em populações finlandesas e suecas com DM1 indicaram que o alelo SOD2 Val em homozigose está associado a um risco aumentado de nefropatia (MOLLSTEN *et al.*, 2009). Resultados semelhantes foram mostrados para pacientes japoneses com DM2 (NOMIYAMA *et al.*, 2003).

A associação do alelo A do rs4880 (VAL), em pacientes com DM1 pode ser explicado devido a diminuição na capacidade antioxidante da enzima causada pela alteração polimórfica (FLEKAC *et al.*, 2008), devido a uma alteração conformacional, tendo como resultado uma proteína com estrutura em folha β parcial, que fica presa no poro mitocondrial, sendo degradada, o que resulta na baixa atividade enzimática (VATS *et al.*, 2015), reforçando a hipótese de que o estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento das complicações diabéticas.

O estudo comparativo do rs4880 mostra que a frequência do alelo de menor frequência no nosso estudo é o alelo A, em concordância com as populações do Egito (EL-MASRY *et al.*, 2005), Suécia (MOLLSTEN *et al.*, 2007) e Argélia (DUTKIEWICZ *et al.*, 2010; EDDAIKRA *et al.*, 2018) finlandesa (MOLLSTEN *et al.*, 2007) e russa (CHISTYAKOV *et al.*, 2001). Enquanto os estudos na República Tcheca (FLEKAC *et al.*, 2008; PACAL *et al.*, 2011), Rússia (CHISTYAKOV *et al.*, 2001), Finlândia (MOLLSTEN *et al.*, 2007) e Polônia (WEGNER *et al.*, 2015) o alelo C é o de menor frequência. Essas observações são provavelmente influenciadas pela etnia e estilo de vida. Além disso, alguns estudos indicam que fatores genotípicos podem influenciar a eficácia dos nutrientes imunológicos, tais como, antioxidantes e ácidos graxos poliinsaturados n-3 (GRIMBLE, 2002).

A frequência do alelo G encontrada no grupo controle e DM1 foi similar à descritas para as populações polonesa (WEGNER *et al.*, 2015), caucasóide (JONES, D. A. *et al.*, 2010; MOHAMMEDI *et al.*, 2014), finlandeses e sueca (MOLLSTEN *et al.*, 2007). No entanto, foi superior a encontrada em chineses (SHAN *et al.*, 2016) e russos (CHISTYAKOV *et al.*, 2001), e inferior a reportada para a população egípcia (52.4% vs 66.3%) (Tabela 9).

TABELA 9. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs4880 DO GENE SOD2 COM DADOS DA LITERATURA

GENE SOD2 rs4880						
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	N	GENÓTIPOS (%)			ALELO (%)
			AA	AG	GG	G
Euro-brasileiros (presente estudo)	Crianças controle	168	23.9	47.6	22.5	52.4
	Crianças DM1	164	22.7	49.7	27.6	52.5
Caucasianos (JONES, D. A. <i>et al.</i> , 2010)	Controles com DAC	602	22.4	56.0	21.6	49.7
	Pacientes DM1	174	28.0	20.0	22.0	54.0
Poloneses (WEGNER <i>et al.</i> , 2015)	Controles	369	23.3	50.1	26.2	48.0
	Pacientes DM1	141	26.2	51.1	22.7	52.0
Finlandeses (MOLLSTEN <i>et al.</i> , 2007)	Controles	358	25.4	51.1	23.5	49.0
	Pacientes DM1	805	26.5	48.9	24.6	50.7
Suecos (MOLLSTEN <i>et al.</i> , 2007)	Controles	197	19.9	51.5	28.6	54.3
	Pacientes DM1	150	28.7	43.3	28.0	48.7
Chineses (SHAN <i>et al.</i> , 2016)	Controles	1614	74.7	23.4	1.9	14.5
Russos (CHISTYAKOV <i>et al.</i> , 2001)	Controles	88	40.9	53.4	5.7	32.4
	DM1 sem neuropatia	82	50.0	50.0	19.5	19.5
	DM1 com neuropatia	84	56.5	43.5	25.0	11.9
Egípcios (EL-MASRY <i>et al.</i> , 2005)	Controles	40	7.5	52.5	40.0	66.3
	DM1	150	32.7	58.7	8.6	62.0
Tchecos (FLEKAC <i>et al.</i> , 2008)	Controles	180	28.9	50.0	25.3	46.1
	DM1	120	65.8	30.0	4.2	19.2
Tchecos (PACAL <i>et al.</i> , 2011)	Adultos DM1	44	22.2	58.2	25.0	48.6
	Crianças DM1	23	12.5	75.0	12.5	50.0
Caucasianos (MOHAMMEDI <i>et al.</i> , 2014)	DM1 sem nefropatia	187	28.4	44.9	26.7	49.1
	DM1 com nefropatia	95	26.4	51.6	22.0	47.8

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM1: diabetes *mellitus* tipo 1.

Fonte: o autor, 2021.

4.3.2 GENE BASIC LEUCINE ZÍPER TRANSCRIPTION FACTOR 2

Os polimorfismos rs3757247 (GRANT *et al.*, 2009) e rs11755527 (COOPER *et al.*, 2008), que estão em desequilíbrio de ligação (LD) estreita, foram associados ao DM1 em indivíduos caucasianos. Ayabe e colaboradores (AYABE *et al.*, 2016) confirmaram a associação do polimorfismo rs3757247 em indivíduos japoneses com DM1 com início na infância. Vários polimorfismos em LD no *locus BACH2* são associados a uma variedade de doenças autoimunes (RICHER; LANG; BUTLER, 2016; YANG *et al.*, 2019), incluindo o DM1 (COOPER *et al.*, 2008; GRANT *et al.*, 2009; ONUMA *et al.*, 2019b). O alelo T foi associado a risco para o DM1 na população japonesa (AYABE *et al.*, 2016; ONUMA *et al.*, 2019a). Contudo, no nosso estudo em uma população sul-brasileira, esta associação não foi repicada, uma vez que não houve diferença entre as frequências genotípicas ($P=0,649$) e alélica ($P=0,331$) entre os grupos (Tabela 10).

TABELA 10. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO rs3757247 NOS GRUPOS EM ESTUDO.

GENE POLIMORFISMO	GENÓTIPO ALELOS	CONTROLES (n = 168)	DM1 (n = 164)	P
BACH2 rs3757247 C > T	C/C	60 (35.7)	52 (31.9)	0.649
	C/T	74 (44.1)	73 (44.2)	
	T/T	34 (20.2)	39 (23.9)	
	H-W (P)	0.206	0.156	0.331
	Alelo T,%	42.3	46.0	
	[95% CI]	[37-48]	[31-51]	

Os valores são apresentados como n (%). Controles, crianças saudáveis; DM1, crianças com diabetes tipo 1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$). IC de 95%, intervalo de confiança de 95%. Probabilidade (P), teste do qui-quadrado; significativo $P < 0,05$ (em negrito).

Fonte: o autor, 2021.

O polimorfismo rs3757247 foi associado ao DM1 em caucasianos (MIRZA *et al.*, 2014; BENTLEY *et al.*, 2019).

A frequência do alelo T na população estudada foi de 42.3% no grupo controle e 46.0% no grupo de crianças com DM1 (Tabela 10), similar ao descrito para a população polonesa (FICHNA *et al.*, 2021), canadense (GRANT *et al.*, 2009) e americana (GRANT *et al.*, 2009) (Tabela 11).

TABELA 11. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3757247 DO GENE BACH2 COM DADOS DA LITERATURA

GENE <i>BACH2</i> rs3757247						
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	N	GENÓTIPOS (%)			ALELOS (%)
			CC	CT	TT	T
Euro-brasileiros (presente estudo)	Crianças controle	168	35.7	44.1	20.2	42.3
	Crianças DM1	164	31.9	44.2	23.9	46.0
Poloneses (WEGNER <i>et al.</i> , 2015)	Controles	368	20.4	48.1	31.5	51.6
	Pacientes DM1	140	18.6	58.6	22.8	48.2
Poloneses (FICHNA <i>et al.</i> , 2021)	Controles	568	31.9	48.0	20.1	44.1
	Pacientes DM1	387	29.5	41.9	18.6	44.6
Britânicos (PAZDERSKA <i>et al.</i> , 2016)	Controles	166	22	46	32	55
Global (PAZDERSKA <i>et al.</i> , 2016)	Controles	5154	23	51	26	52
Japoneses (ONUMA <i>et al.</i> , 2019b)	Controles	179	18,4	47,5	34,1	42,2
Metanálise Canadenses e norte-americanos (GRANT <i>et al.</i> , 2009)	Crianças controle	-	-	-	-	45,5
	Crianças DM1	-	-	-	-	50,4
(HAPMAP, 2021b) Americanos	Controles	-	-	-	-	40,5
(HAPMAP, 2021b) Europeus	Controles	-	-	-	-	52,3
(1000GENOMES, 2021a) Americanos	Controles	-	-	-	-	49,0
(1000GENOMES, 2021a) Europeus	Controles	-	-	-	-	48,8

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM1: diabetes *mellitus* tipo 1, -: dados não disponíveis.
Fonte: o autor, 2021.

Marroquini e colaboradores (2014) confirmaram o papel crucial do gene *BACH2* na regulação da morte das células β induzida por citocinas, além de seu papel na regulação da inflamação ao nível do sistema imunológico. Sendo esse gene expresso e modulado por citocinas pró-inflamatórias das ilhotas pancreáticas humanas, sua inibição exacerba o estímulo para a apoptose das células β , induzida por citocinas através da ativação da via JNK1/BIM, além de desempenhar um papel relevante e direto nas células β expostas a um ataque autoimune, como ocorre no DM1.

Concordando com a hipótese de Roychoudhuri e colaboradores (2013) à respeito do papel regulador do gene na diferenciação das células T CD4⁺ com função de prevenir doenças inflamatórias e controlar o equilíbrio entre tolerância e imunidade, embora esclarecer o mecanismo de como isso acontece e como o rs3757247 influencia nesse mecanismo, ainda seja necessário.

Provavelmente, uma das razões de uma associação negativa entre o rs37577247 polimorfismo em BACH2 e risco de DM1 poderia ser a contribuição extremamente modesta dos *loci* não HLA para o desenvolvimento do DM1 associado à região HLA (STECK *et al.*, 2012). Além disso, foi mostrado que o polimorfismo rs3757247 de BACH2 facilita a autoimunidade em vez de aumentar o risco para o DM1 em si (DE GRAAFF *et al.*, 2011; PLAGNOL *et al.*, 2011) Na análise de associação ampla do genoma para positividade de autoanticorpos em pacientes com DM1, foi encontrada associação entre o alelo de menor frequência do rs3757247 e a maior positividade de autoanticorpos contra a enzima peroxidase tireoidiana (DE GRAAFF *et al.*, 2011). Isso levou à conclusão de que este polimorfismo aumentou o risco de doença de Graves (PLAGNOL *et al.*, 2011), não DM1 em si. Além disso, foi mostrado que ratos Bach2^{-/-} apresentam respostas deficientes IgG dependentes e células T independentes, o que mostra que Bach2 é importante para a reação imunológica e desempenha um papel importante na resposta autoimune (MUTO *et al.*, 2004).

Notadamente, o polimorfismo rs3757247 de BACH2 pode estar associado a um risco de retinopatia (WEGNER *et al.*, 2015). Este achado pode surgir o papel de BACH2 na indução de apoptose sob estresse oxidativo. BACH2 é um fator pró-apoptótico, pois inibe genes antioxidantes e anti-apoptóticos na resposta de produção aumentada de ROS (TASHIRO *et al.*, 2004). O estresse oxidativo está associado à condição diabética e é um dos mecanismos mais comuns que levam ao desenvolvimento de retinopatia (TARR *et al.*, 2013). Contudo, mais estudos em grande escala devem ser realizados para concluir se o polimorfismo rs3757247 de BACH2 representa novos *loci* na patogênese do DM1 e/ou retinopatia diabética.

4.3.3 GENE METALOPROTEINASE DE MATRIX 9

O gene MMP9 localizado no cromossomo humano 20, tem relatos sugerindo que variações polimórficas afetam a expressão das MMPs, o que pode contribuir para a ocorrência de doenças (WU, H. D. *et al.*, 2013). Além disso, foi descrito o papel de integração de vias imunorregulatórias das MMPs (LAVINI-RAMOS *et al.*, 2017) e foi observado maiores concentrações de MMP-9 mais elevadas em pacientes com DM1 (DEROSA *et al.*, 2005; ROGOWICZ-FRONTCZAK *et al.*, 2014; WOO *et al.*, 2016),

Neste estudo, o polimorfismo rs17576, localizado na região promotora do gene, não apresentou diferença entre os grupos nas frequências alélicas ($P=0.709$) e genótípicas ($P=0.895$) (TABELA 12).

TABELA 12. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO rs17576 NOS GRUPOS EM ESTUDO.

GENE POLIMORFISMO	GENÓTIPO ALELOS	CONTROLES (n = 168)	DM1 (n = 164)	P
MMP9 rs17576 G > A	A/A	83 (49.4)	79 (48.2)	0.895
	A/G	72 (42.8)	70 (42.7)	
	G/G	13 (7.8)	15 (9.1)	
	H-W (P)	0.629	0.928	0.709
	Alelo G,% [95% CI]	29.2 [24-34]	30.5 [26-35]	

Os valores são apresentados como n (%). Controles, crianças saudáveis; DM1, crianças com diabetes tipo 1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$). IC de 95%, intervalo de confiança de 95%. Probabilidade (P), teste do qui-quadrado; significativo $P < 0,05$ (em negrito).

Fonte: o autor, 2021.

A frequência do alelo G na população de crianças controle sul-brasileiras desse estudo (29.2%) foi similar ao encontrado em estudo com mulheres sul-brasileiras saudáveis (27.1%) (COSTA, C. D. *et al.*, 2018) e indivíduos usados como controle (31.2%), também brasileiros no estudo de Figueiredo e colaboradores (2020). Mas a frequência do alelo G foi inferior a encontrada nas populações europeias (29.2% vs 36,4%) (HAPMAP, 2021c), americanas (29.5% vs 48,6%) e asiáticas (29.5% vs 68.9%) (HAPMAP, 2021c) (Tabela 13).

Um dado que merece ser destacado é a frequência do alelo G para a população iraniana, com frequência de 92.5%, diferente de todas as outras encontradas, teve como o alelo menos frequente o alelo A (7.5%) (SARAVANI

et al., 2017), não havendo justificativa em literatura para essa diferença, além da etnia e o estilo de vida (EDDAIKRA *et al.*, 2018).

TABELA 13. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs17576 DO GENE MMP9 COM DADOS DA LITERATURA

GENE <i>MMP9</i> rs17576						
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	n	GENÓTIPOS (%)			ALELO (%)
			AA	AG	GG	G
Euro-brasileiros (presente estudo)	Crianças controle	168	49.4	42.8	7.8	29.2
	Crianças DM1	164	48.2	42.7	9.1	30.5
Brasileiros (COSTA, C. D. <i>et al.</i> , 2018)	Mulheres saudáveis	131	54.2	37.4	8.4	27.1
Brasileiros (FIGUEIREDO <i>et al.</i> , 2020)	Controles	557	47.8	52.0	10.2	31.2
Iranianos (SARAVANI <i>et al.</i> , 2017)	Controles	120	0.0	15.0	85.0	92.5
Caucasianos (ALBERT <i>et al.</i> , 2019)	Controles	162	89.9	44.8	69.0	34.5
Global (HAPMAP, 2021c)	Controles	1892	-	-	-	46.8
Americanos (HAPMAP, 2021c)	Controles	770	-	-	-	48.6
Africanos (HAPMAP, 2021c)	Controles	692	-	-	-	39.5
Asiáticos (HAPMAP, 2021c)	Controles	254	-	-	-	68.9
Europeus (HAPMAP, 2021c)	Controles	176	-	-	-	36.4
Global (1000GENOMES, 2021b)	Controles	5008	-	-	-	45.5
Europeus (1000GENOMES, 2021b)	Controles	1006	-	-	-	38.1
Americanos (1000GENOMES, 2021b)	Controles	694	-	-	-	22.8

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM1: diabetes *mellitus* tipo 1, -: dados não disponíveis. Fonte: o autor, 2021.

O genótipo GG do polimorfismo rs17576 foi associado ao DM2 e suas complicações cardiovasculares e nefropáticas (AHLUWALIA *et al.*, 2009; ALBERT *et al.*, 2019), ao DMG (COSTA, C. D. *et al.*, 2018), ao glaucoma em paquistaneses (MICHEAL *et al.*, 2013) e a DAC em indianos (MISHRA *et al.*,

2012). Um estudo brasileiro, realizado com mulheres, sugere que a presença do alelo A (rs17576) pode contribuir para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares e cânceres associados à obesidade (ANDRADE *et al.*, 2012), e o genótipo AA foi associado ao maior risco para desenvolver DM2 em indivíduos iranianos (SARAVANI *et al.*, 2017).

Não foram encontrados na literatura outros estudos que tenham analisado esta variante em populações de crianças com DM1. Até o momento, este é o primeiro estudo que levanta a frequência alélica e genotípica do polimorfismo rs17576 do gene MMP9 em crianças euro-brasileiros com a doença.

4.3.4 GENE APOLIPOPROTEÍNA C3

Foi descrito que apoC3 contribui para disfunção das células β (JUNTTI-BERGGREN *et al.*, 2004). Além disso, foi reportado que crianças com DM1 apresentam concentrações aumentadas de apoC3 (BLACKETT, P. *et al.*, 1988) e foi demonstrado associação do DM1 com duas variantes genéticas, o rs2854116 (T455C) e rs2854117 (C482T), localizadas na região promotora do gene *APOC3*.

Um das variantes alélicas mais estudadas do gene *APOC3* é o polimorfismo rs5128, localizado na região 3' UTR, o qual é caracterizado por uma substituição de uma citosina por uma guanina (C>G) (RAI *et al.*, 2016). Outra variante selecionada para esse estudo foi o rs2542052 (C>A), localizado na região promotora do gene, com associação à sensibilidade à insulina (ATZMON *et al.*, 2006).

Neste estudo, não encontramos associação do rs5128 com o DM1. As frequências genotípicas ($P=0.545$) e alélica ($P=0.513$) não foram diferentes entre os grupos (TABELA 14).

TABELA 14. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS rs5128 E rs2542052 NOS GRUPOS EM ESTUDO

GENE POLIMORFISMO	GENÓTIPO ALELOS	CONTROLES (n = 168)	DM1 (n = 164)	P
APOC3 rs5128 C>G	C/C	123 (73.2)	127 (77.3)	0.545
	C/G	43 (25.6)	34 (20.8)	
	G/G	2 (1.2)	3 (1.9)	
	H-W (P)	0.409	0.691	0.513
	Alelo G,% [95% CI]	14.0 [9-20]	12.3 [8-18]	
Modelo codominante				
APOC3 rs2542052 C>A	C/C	46 (27.4)	21 (12.8)	<0.001
	C/A	95 (56.5)	76 (46.3)	
	A/A	27 (16.1)	67 (40.9)	
	H-W (P)	0.060	0.939	<0.001
	Alelo A,% [95% CI]	44.3 [39-50]	64.0 [59-69]	
Modelo dominante				
	C/C	46	21	0.0009
	C/A+A/A	122	143	
Modelo recessivo				
	A/A	27	67	<0.001
	C/C+C/A	141	97	

Os valores são apresentados como n (%). Controles, crianças saudáveis; DM1, crianças com diabetes tipo 1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (P> 0,05). IC de 95%, intervalo de confiança de 95%. Probabilidade (P), teste do qui-quadrado; significativo P <0,05 (em negrito).

Fonte: o autor, 2021.

A frequência do alelo G encontrado nesse estudo para o grupo controle (14%) foi semelhante ao encontrado para iranianos (19,0 e 19,3%) (HOSSEINI-ESFAHANI *et al.*, 2015) (HOSSEINI-ESFAHANI *et al.*, 2017), árabes (14.0% e 19.0%) (ALHARBI *et al.*, 2015) (MALALLA *et al.*, 2019) e inferior ao reportado para caribenhos (29,0%) (SMITH *et al.*, 2009), chineses (32,8%) (RUIXING *et al.*, 2010), chineses Han (30,0%) (WU, Y. *et al.*, 2016) e indianos (RAI *et al.*, 2016) (Tabela 15).

TABELA 15. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs5128 DO GENE APOC3 COM DADOS DA LITERATURA

GENE APOC3 rs5128						
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	N	GENÓTIPOS (%)			ALELO (%)
			CC	CG	GG	G
Euro- brasileiros	Crianças controle	168	73.2	25.6	1.2	29.2
	Crianças DM1	164	77.3	20.8	1.9	30.5

(presente estudo)							
Iranianos (MARATEB <i>et al.</i> , 2018)	Controles	418	83.0	16.7	0.2	8.6	
Iranianos (HOSSEINI-ESFAHANI <i>et al.</i> , 2015)	Controles	406	44.0	33.0	3.0	19.3	
Iranianos (HOSSEINI-ESFAHANI <i>et al.</i> , 2017)	Controles	406	44.0	33.0	3.0	19.0	
Marroquinos (LAKBAKBI EL YAAGOUBI <i>et al.</i> , 2017)	Controles	86	87.2	11.7	1.1	7.0	
Árabes (ALHARBI <i>et al.</i> , 2015)	Controles	255	74.1	23.9	2.0	14.0	
Árabes (MALALLA <i>et al.</i> , 2019)	Controles	733	68.0	26.0	6.0	19.0	
Caribenhos (SMITH <i>et al.</i> , 2009)	Controles	557	57	28	15	29	
Chineses (RUIXING <i>et al.</i> , 2010)	Controles	516	45.7	43.0	11.3	32.8	
Han chineses (WU, Y. <i>et al.</i> , 2016)	Controles	2036	49.3	41.3	9.4	30.0	
Indianos (RAI <i>et al.</i> , 2016)	Controles	200	59.0	37.0	3.3	22.0	

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM1: diabetes *mellitus* tipo 1, -: dados não disponíveis. Fonte: o autor, 2021.

Não foi possível comparar a frequência genotípica e alélica com outros indivíduos DM1, devido à falta de publicações com essa população. Entretanto, diferentes estudos realizados com o rs5128 em diferentes populações mostraram que marroquinos (LAKBAKBI EL YAAGOUBI *et al.*, 2017), chineses heterozigotos (CG) (WU, Y. *et al.*, 2016), iranianos portadores do alelo C (HOSSEINI-ESFAHANI *et al.*, 2015) e espanhóis homozigotos para o alelo menos comum (GG) (CLEMENTE-POSTIGO *et al.*, 2010), possuem maior risco para desenvolvimento de síndrome metabólica.

Essa variante também já foi associada a concentrações elevadas de TG (MAR *et al.*, 2004; QI, L. *et al.*, 2007; BANDEGI *et al.*, 2011; SONG, Y. *et al.*,

2015), colesterol total e LDL-c, além da resistência à insulina para indivíduos com genótipo GG (ALHARBI *et al.*, 2015; SONG, Y. *et al.*, 2015).

O possível mecanismo sob o qual o polimorfismo rs5128 modula a apoC3 plasmática ainda não foi totalmente esclarecido, porém uma possível explicação seria que o alelo G aumenta a atividade transcricional do gene *APOC3* e eleva as concentrações plasmáticas da apolipoproteína, pois grupos distintos de pesquisadores, Song e colaboradores (2015) e Malalla e colaboradores (2019), evidenciaram um aumento significativo nas concentrações de apoC3 em indivíduos portadores do alelo G frente aos indivíduos com genótipo CC.

Este polimorfismo foi associado a alterações no metabolismo lipídico (ORDOVAS *et al.*, 1991), a concentrações elevadas de apoC3 e TG (SHOULDERS *et al.*, 1991; TALMUD; HUMPHRIES, 1997) e a DAC (Doença Arterial Coronariana) (SURGUCHOV *et al.*, 1996), todas complicações associadas ao diabetes, sendo justificado devido a apolipoproteína C3 prejudicar a lipólise das TRL inibindo a lipoproteína lipase (LPL) e a captação hepática das TRLs pelos receptores remanescentes (MALALLA *et al.*, 2019).

Existem poucos estudos envolvendo o polimorfismo rs2542052, tendo sido associado à longevidade [Novelli, 2008 #6290] e a concentrações de HDL (ATZMON *et al.*, 2006). Neste estudo o polimorfismo rs2542052 foi associado a risco para o DM1, estando presente em uma frequência cerca de 20% a mais no grupo DM1, quando comparado a controles saudáveis nos três modelos apresentados ($P < 0.001$) (TABELA 14).

A frequência do alelo A do grupo controle desse estudo foi similar à outras populações, espanhola, europeia e americana, mas os africanos apresentam uma frequência 1,7 vezes menor (44.3% vs 25.5%) (Tabela 16).

TABELA 16. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2542052 DO GENE *APOC3* COM DADOS DA LITERATURA.

GENE <i>APOC3</i> rs2542052						
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	N	GENÓTIPOS (%)			ALELO (%)
			CC	CA	AA	A
Euro-brasileiros (presente estudo)	Crianças controle	168	27.4	56.5	16.1	44.3
	Crianças DM1	164	12.8	46.3	40.9	64.0

Espanhóis (DELGADO- LISTA <i>et al.</i> , 2010)	Homens saudáveis	88	31.8	56.8	11.4	40.0
Global (HAPMAP, 2021a)	Controles	1892	-	-	-	44.1
Europeus (HAPMAP, 2021a)	Controles	115.036	-	-	-	38.6
Latino-americano (HAPMAP, 2021a)	Controles	5746	-	-	-	37.3
Europeus (HAPMAP, 2021a)	Controles	1006	-	-	-	39.2
Americanos (HAPMAP, 2021a)	Controles	694	-	-	-	46.4
Global (1000GENOMES, 2021d)	Controles	5008				45.4
Africanos (1000GENOMES, 2021d)	Controles	1322	-	-	-	25.5
Europeus (1000GENOMES, 2021d)	Controles	1006	-	-	-	60.7
Americanos (1000GENOMES, 2021d)	Controles	694	-	-	-	53.6

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM1: diabetes *mellitus* tipo 1, -: dados não disponíveis.
Fonte: o autor, 2021.

Em ensaios *in vivo*, a transcrição de *APOC3* parece ser dependente de insulina, além de outros fatores [Li, 1995 #8025]. Um estudo evidenciou que indivíduos portadores do genótipo CC para o polimorfismo rs2542052 apresentaram concentrações séricas de apoC3 menores e maior sensibilidade à insulina quando comparados aos indivíduos portadores dos genótipos CA ou AA (ATZMON *et al.*, 2006), embora esse polimorfismo esteja localizado na região IRE (elemento de resposta à insulina) do gene.

Consequentemente, a insulina suprime a expressão gênica da *APOC3* (CHEN, M. *et al.*, 1994; LI, W. W. *et al.*, 1995), podendo ser uma explicação para a concentração de apoC3 ser mais elevada em indivíduos com DM1 [Ginsberg,

2019 #9037], contudo as causas desse aumento não são totalmente compreendidas [Ginsberg, 2019 #9037].

No entanto, experimentos com camundongos induzidos ao diabetes (modelos para DM1) deixou evidente que o DM1 aumenta concentrações plasmáticas de apoC3, não pela alta concentração de glicose no sangue, mas devido principalmente devido à deficiência de insulina [Kanter, 2019 #9098].

Sendo assim, os resultados obtidos nesse sugerem risco para portadores do alelo A ao DM1 na população estudada, sendo esse o primeiro *report* para a indivíduos com DM1, ao nosso conhecimento, o que impossibilitou a comparação a dados obtidos com a literatura. Sendo esse o primeiro relato do efeito deste alelo na população brasileira com crianças, é necessário a confirmação desses resultados em outras populações e na população brasileira utilizando um maior tamanho amostral, especialmente desenhados para avaliar esta associação, podendo apresentar uma resposta de interesse para a relação do polimorfismo com o DM1 em humanos.

O rastreamento de variantes genéticas do gene *APOC3* são importantes no que diz respeito à susceptibilidade ou proteção do DM1. Se as variantes polimórficas afetam de fato as concentrações plasmática de apoC3, a terapia precoce com insulina poderia ajudar a prevenir o aumento plasmático de apoC3, que leva a apoptose das células β , seguida da diminuição da secreção de insulina, caracterizando os sintomas clínicos da doença (HOKANSON *et al.*, 2006).

4.3.5 GENE APOLIPOPROTEÍNA M

O gene *APOM* está localizado na região p21.31 do cromossomo humano 6, na região do complexo principal de histocompatibilidade de classe III (HLA-III), que é rica em genes envolvidos na imunidade e inflamação. Portanto, especula-se que *APOM* pode ser regulado por estímulos inflamatórios. Esta vinculação foi apoiada por um estudo que mostrou que a inflamação resulta na diminuição da expressão de *APOM* (FEINGOLD *et al.*, 2008).

Além disso, apoM é um membro da família das lipocalinas e um importante carreador do pequeno lipídeo bioativo esfingosina-1-fosfato (S1P) (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2011). O complexo apoM / S1P está ligado a todas

as lipoproteínas, principalmente ligadas e transportadas por lipoproteínas de alta densidade (HDLs) (XU, N.; DAHLBACK, 1999; CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2006) e, juntas, apoM, S1P e HDL regulam o tráfego imunológico e a ativação em sistemas imunes inatos e adaptativos (TSAI; HAN, 2016). Além disso, foi sugerido que um ceralifimod, um agonista seletivo do receptor de esfingosina 1-fosfato de segunda geração para os receptores 1 e 5 da esfingosina 1-fosfato, pode atrasar o início e a progressão do diabetes mellitus tipo 1 em camundongos diabéticos não obesos (NOD) (SHIOYA *et al.*, 2021).

As frequências genóticas e alélicas para os polimorfismos rs805264 e rs707921 do gene *APOM*, e as comparações entre os grupos estão apresentados na Tabela 17.

TABELA 17. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS NOS GRUPOS EM ESTUDO.

GENE POLIMORFISMO	GENÓTIPO ALELOS	CONTROLES (n = 168)	DM1 (n = 164)	P
<i>APOM</i> rs805264 G > A	G/G	148 (88.1)	144 (88.3)	0.367
	A/G	18 (10.7)	19 (11.6)	
	A/A	2 (1.2)	0 (0.0)	
	H-W (P)	0.167	0.427	
	Alelo A,%	6.5	5.8	0.701
	[95% CI]	[4-9]	[3-8]	
<i>APOM</i> rs707921 C > A	C/C	134 (79.8)	144(87.7)	0.083
	A/C	32 (19.0)	20 (12.3)	
	A/A	2 (1,2)	0 (0.0)	
	H-W (P)	0.947	0.404	
	Alelo A,%	10.7	6.1	0.034
	[95% CI]	[7-14]	[4-9]	

Os valores são apresentados como n (%). Controles, crianças saudáveis; DM1, crianças com diabetes tipo 1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (P> 0,05). IC de 95%, intervalo de confiança de 95%. Probabilidade (P), teste do qui-quadrado; significativo P <0,05 (em negrito).

Fonte: o autor, 2021.

As frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos rs805264 e rs707921 não foram diferentes (P>0,05) entre crianças saudáveis e aquelas com DM1 neste estudo, conforme demonstrado na Tabela 17, sugerindo que as variantes do gene *APOM* estudadas não estão associadas ao DM1 na amostra populacional em estudo.

Estes dois polimorfismos também não foram associados ao Lúpus eritematoso sistêmico (DU *et al.*, 2017) ou DM2 (ZHOU, J. W. *et al.*, 2011) em

uma população chinesa, contudo foi demonstrado que estes polimorfismos e o rs707922 estão em desequilíbrio de ligação (HAN; JIA, 2007; ZHOU, J. W. *et al.*, 2011). Embora os polimorfismos rs805264, rs707921 e rs707922 não tenham sido associados ao risco para DM2, foram associados a concentrações plasmáticas de colesterol total, LDL-C e apoM (ZHOU, J. W. *et al.*, 2011).

A TABELA 18 apresenta a comparação das frequências genotípicas e alélicas deste estudo para o polimorfismo rs805264 com outras populações. A frequência do alelo A no grupo controle foi similar as populações Europeia (4,0%) e Americana (8,1%) e inferior a Africana (14,9%) e Asiática (13,7%) segundo HAPMAP (Tabela 19).

TABELA 18. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs805264 DO GENE APOM COM DADOS DA LITERATURA

GENE APOM rs805264						
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	N	GENÓTIPOS (%)			ALELO (%)
			GG	GA	AA	A
Euro-brasileiros (presente estudo)	Crianças controle	168	88.1	10.7	1.2	6.5
	Crianças DM1	164	88.2	11.8	0.0	6.1
Chineses (ZHOU, J. W. <i>et al.</i> , 2011)	Controles	592	64.4	30.1	5.6	20.6
Global (1000GENOMES, 2021c)	Controles	5008	-	-	-	9.2
Americanos (1000GENOMES, 2021c)	Controles	694	-	-	-	5.8
Europeus (1000GENOMES, 2021c)	Controles	1006	-	-	-	3.2
Africanos (1000GENOMES, 2021c)	Controles	1322	-	-	-	14.9
Asiáticos (1000GENOMES, 2021c)	Controles	1008	-	-	-	13.7
Americanos (HAPMAP, 2021e)	Controles	770	-	-	-	8.1
Europeus (HAPMAP, 2021e)	Controles	176	-	-	-	4.0

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM1: diabetes *mellitus* tipo 1, -: dados não disponíveis.
Fonte: o autor, 2021

A frequência do alelo A do polimorfismo rs797021 no grupo controle foi similar as populações Latina americana (7,2% e 10,3%) e Americana (9,1%) e inferior a Africana (17,3%) e Asiática (11,4%), foi maior que a frequência relatada em europeus (4.5%), segundo HAPMAP (Tabela 19).

TABELA 19. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs707921 DO GENE APOM COM DADOS DA LITERATURA

GENE APOM rs797021						
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	N	GENÓTIPOS (%)			ALELOS (%)
			CC	CA	AA	A
Euro- brasileiros (presente estudo)	Crianças controle	168	79.8	19.0	1.2	10.7
	Crianças DM1	164	87.7	12.3	0.0	6.1
Mulao (AUNG <i>et al.</i> , 2013)	Adultos saudáveis	703	52.77	38.55	8.67	27.9
Han chineses (AUNG <i>et al.</i> , 2013)	Adultos saudáveis	707	58.0	33.70	8.30	25.3
Chineses (ZHOU, J. W. <i>et al.</i> , 2011)	Controles	601	64.1	30.1	5.8	20.9
Latino americanos (HAPMAP, 2021d)	Controles	1080 7508	- -	- -	- -	10.3 7.2
Global (HAPMAP, 2021d)	Controles	1890	-	-	-	12.1
Africanos (HAPMAP, 2021d)	Controles	768	-	-	-	17.3
Americanos (HAPMAP, 2021d)	Controles	692	-	-	-	9.1
Europeus (HAPMAP, 2021d)	Controles	176	-	-	-	4.5
Asiáticos (HAPMAP, 2021d)	Controles	664	-	-	-	11.4

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM1: diabetes *mellitus* tipo 1, -: dados não disponíveis.
Fonte: o autor, 2021

Embora não tenhamos encontrado associação dessas variantes com o DM1 nessa população, estudos relataram que outras variantes do gene conferem risco para artrite reumatoide (HU, H. J. *et al.*, 2011; HUANG, Y. *et al.*, 2014), DM1 (WU, X. *et al.*, 2009), DM2 (NIU *et al.*, 2007; ZHOU, J. W. *et al.*, 2011), além da DAC (JIAO *et al.*, 2007).

Além disso, outra informação altamente relevante foi a descoberta de que o rs707922 também pode assumir função de um SNP exônico, dando como resultado duas isoformas de APOM, APOM1 e APOM5 (Figura 25), o que ainda exige elucidação sobre determinadas funções, ficou evidente que as altas concentrações de expressão renal e hepática de APOM1 e APOM5 indicaram a possibilidade que esses diferentes transcritos regulem a homeostase do colesterol nesses tecidos (ZHOU, J. W. *et al.*, 2011).

Devido ao importante papel de apoM em doenças autoimunes, é essencial compreender o papel das variações gênicas presente no gene *APOM* em relação às doenças autoimunes, uma vez que as alterações genéticas na região promotora podem impactar de alguma forma o controle da expressão gênica podendo estar associado ao maior risco de desenvolver a doença (DU *et al.*, 2017).

4.3.6 GENE FATOR NUCLEAR DOS HEPATÓCITOS 1 α

O gene HNF1 α , codifica um fator de transcrição que se liga aos promotores de um variedade de genes expressos predominantemente no fígado (ODOM *et al.*, 2004) e as alterações gênicas podem interferir na expressão do gene modificando o desenvolvimento pancreático (NAQVI; HASAN; HASSAN, 2018).

As frequências genotípicas e alélicas e as comparações entre os grupos para o polimorfismo rs7310409 do gene *HNF1A* estão apresentados na Tabela 20, não havendo diferença estatística entre os grupos de estudo.

Esta variante rs7310409 foi ligada a mudanças nas concentrações de PCR (RIDKER *et al.*, 2008; HSU *et al.*, 2011), um marcador para doenças cardiovasculares, e implicada na síndrome coronariana aguda (DLOUHA *et al.*, 2012), DAC em chineses (LIU, R. *et al.*, 2014) e iranianos (BARZI; GHADERIAN;

NOORMOHAMMADI, 2017), além do risco para desenvolver câncer de pâncreas (PIERCE; AHSAN, 2011).

TABELA 20. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS NOS GRUPOS EM ESTUDO.

GENE POLIMORFISMO	GENÓTIPO ALELOS	CONTROLES (n = 168)	DM1 (n = 164)	P
<i>HNF1A</i> rs7310409 G > A	G/G	57 (33.9)	56 (34.4)	0.856
	A/G	80 (47.6)	74 (44.8)	
	A/A	31 (18.5)	34 (20.8)	
	H-W (P)	0.753	0.346	0.619
	Alelo A,%	42.3	44.2	
	[95% CI]	[37-48]	[39-50]	

Os valores são apresentados como n (%). Controles, crianças saudáveis; DM1, crianças com diabetes tipo 1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (P> 0,05). IC de 95%, intervalo de confiança de 95%. Probabilidade (P), teste do qui-quadrado; significativo P <0,05 (em negrito).

Fonte: o autor, 2021.

Nossos resultados não evidenciaram qualquer relação entre o rs7310409 e o DM1 (P=0.619), sendo possível visualizar as comparações alélicas e genotípicas com outras populações na tabela 21.

TABELA 21. COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs7310409 DO GENE *HNF1α* COM DADOS DA LITERATURA.

GENE <i>HNF1A</i> rs7310409						
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	N	GENÓTIPOS (%)			ALELO (%)
			GG	GA	AA	A
Euro-brasileiros (presente estudo)	Crianças controle	168	33.9	47.3	18.9	42.3
	Crianças DM1	164	34.7	44.8	20.8	44.2
Europeus (POTJER <i>et al.</i> , 2015)	Controles	135	-	-	-	39.0
Caucasianos (PIERCE; AHSAN, 2011)	Controles	-	-	-	-	40.0
Suecos (RICHTER, D. <i>et al.</i> , 2012)	Controles	109	38.0	48.0	14.0	39.1
Iranianos (BARZI; GHADERIAN; NOORMOHAMMADI, 2017)	Controles	202	39.6	38.1	22.3	68.7

Global (HAPMAP, 2021f)	Controles	1886	-	-	-	38.3
Americanos (HAPMAP, 2021f)	Controles	770	-	-	-	41.4
Africanos (HAPMAP, 2021f)	Controles	686	-	-	-	29.0
Asiáticos (HAPMAP, 2021f)	Controles	254	-	-	-	49.2
Europeus (HAPMAP, 2021f)	Controles	176	-	-	-	44.9

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM1: diabetes *mellitus* tipo 1, -: dados não disponíveis.
Fonte: o autor, 2021

A frequência do alelo A do rs7310409 encontrada neste estudo para crianças saudáveis (42,3%), foi similar à relatada para americanos (41.4%), europeus (44,9%) e Suecos (39,1%) e significativamente maior que a encontrada para africanos (29,0%) em 1.5 vezes e menor para iranianos (68.7%) em 1.7 vezes (Tabela 21).

Atualmente, sabe-se que a supressão gênica do gene *HNF1A* leva a diminuição da secreção de insulina, proliferação de células β e à estrutura anormal das Ilhotas de Langerhans, em resposta à produção insuficiente da proteína (VALKOVICOVA *et al.*, 2019).

Haliyur e colaboradores (2019), elaboraram um dos primeiros estudos diretos de ilhotas humanas de um indivíduo com uma variante heterozigótica do gene *HNF1A* (*HNF1A*^{T260M}), o qual tinha massa de células β relativamente normal e manteve muitos marcadores-chave da identidade das células β , mas com falha na liberação de insulina em resposta à glicose. Este *déficit* secretor de insulina foi acompanhado por alterações nos genes que codificam as vias do metabolismo da glicose e da produção de ATP, e também foram associadas a mudanças nas funções metabólicas essenciais, como transcrição gênica, síntese e degradação de proteínas, resposta proteica e comunicações intra e intercelulares (HALIYUR *et al.*, 2019). Com esses resultados, propuseram que essa classe de variantes, leva ao diabetes com insuficiência de insulina, não por perda significativa das células β , mas por regulação inadequada dos fatores de transcrição das células β , levando ao comprometimento das vias necessárias para resposta à insulina frente a glicose (HALIYUR *et al.*, 2019).

Desse modo, podemos ressaltar que a importância da busca por novos e específicos biomarcadores, permitam através do diagnóstico molecular, que equívocos no diagnóstico de indivíduos com diabetes sejam evitados, uma vez que o diagnóstico interfere no tratamento do indivíduo, evitando o uso inadequado de insulina ou a falta dela para indivíduos com DM1.

4.4 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO

Foram identificadas correlações significativas entre os polimorfismos e os parâmetros bioquímicos com a amostra controle bem como com a amostra DM1 (TABELA 22).

A análise de correlação linear foi realizada na busca de associações entre os polimorfismos e os biomarcadores laboratoriais. Os valores do coeficiente de correlação (r) observados indicam correlações positivas e fracas ($r < 0.5$), sugerindo que o efeito dos polimorfismos pode ser ao acaso.

Em todas as correlações significativas foram realizadas análises de variância (ANOVA) para identificar possíveis efeitos das variantes genéticas sobre os parâmetros correlacionados.

TABELA 22. CORRELAÇÕES SIGNIFICATIVAS ($P < 0.005$) ENTRE ALGUNS POLIMORFISMOS E PARÂMETROS LABORATORIAIS NOS GRUPOS EM ESTUDO

GENE POLIMORFISMO	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	CONTROLES	DM1
<i>BACH2</i> rs3757247	HDL-C	—	$r=0.1756$ P=0.024
<i>APOM</i> rs805264 G > A	HDL-C apoM	— $r=0.2211$ P=0.017	$r=0.1826$ P=0.019 $r=-0.1471$ P=0.112
<i>APOM</i> rs707921 C > A	PROTEÍNA TOTAL HDL-C	— —	$r=0.2080$ P=0.008 $r=0.1632$ P=0.037
<i>HNF1A</i> rs7310409 G > A	HbA1c	$r=0.1556$ P=0.044	—

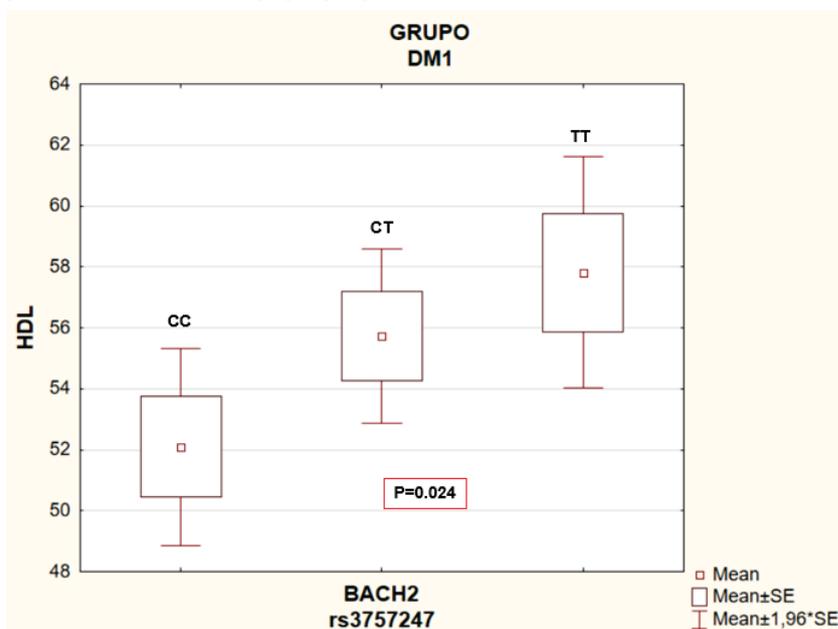
LEGENDA: r =coeficiente de correção de Pearson, P: probabilidade da correlação
FONTE: O autor (2018)

Na busca por correlações entre os polimorfismos estudados e os marcadores bioquímicos, encontramos uma correlação (fraca) entre o rs3757247 e o HDL-C ($r=0.1756$, $P=0.024$) no grupo DM1 (FIGURA 30).

Embora os indivíduos com DM1 tenham resistência à insulina, paradoxalmente, o HDL-c é frequentemente maior em pessoas com DM1 do que em controles não diabéticos (WADWA *et al.*, 2005; GUY *et al.*, 2009), concordante com o encontrado nesse estudo, embora diferença entre os indivíduos controle e DM1 [50,6 (42,0–58,0) vs 55,1 (46,0–63,0)] seja sutil (TABELA 7).

No entanto, evidências sugerem que o HDL em DM1 pode se tornar disfuncional e pró-aterogênico, ao invés de cardioprotetor (TELL; NADEAU; ECKEL, 2020). Em um estudo com adolescentes DM1, a disfunção de HDL foi observada em indivíduos com inflamação ou albuminúria (CHIESA *et al.*, 2019) e partículas de HDL isoladas de indivíduos com DM1 apresentaram capacidade anti-inflamatória prejudicada (LLAURADO *et al.*, 2019) e sua função reduzida em jovens adultos com a doença, sendo essa redução observada após o início da patologia, persistindo ao longo do tempo (HEIER *et al.*, 2017), o que é consistente com os dados Gourgari e colaboradores (2018), que demonstraram que a capacidade de efluxo de colesterol encontrava-se diminuída em indivíduos DM1, devido a função atribuída ao HDL no transporte reverso do colesterol. A partir disso, propomos de forma hipotética que indivíduos portadores do alelo T (rs3757247-T), possam ter um perfil lipídico alterado e levem a complicações mais acentuadas e severas, uma vez que já está bem estabelecido que alterações polimórficas no *locus BACH2* estão relacionados a múltiplas doenças inflamatórias em humanos (ROYCHOUDHURI *et al.*, 2013).

FIGURA 31. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs3757247 DO GENE *BACH2* COM AS CONCENTRAÇÕES DE HDL PARA O GRUPO DM1.



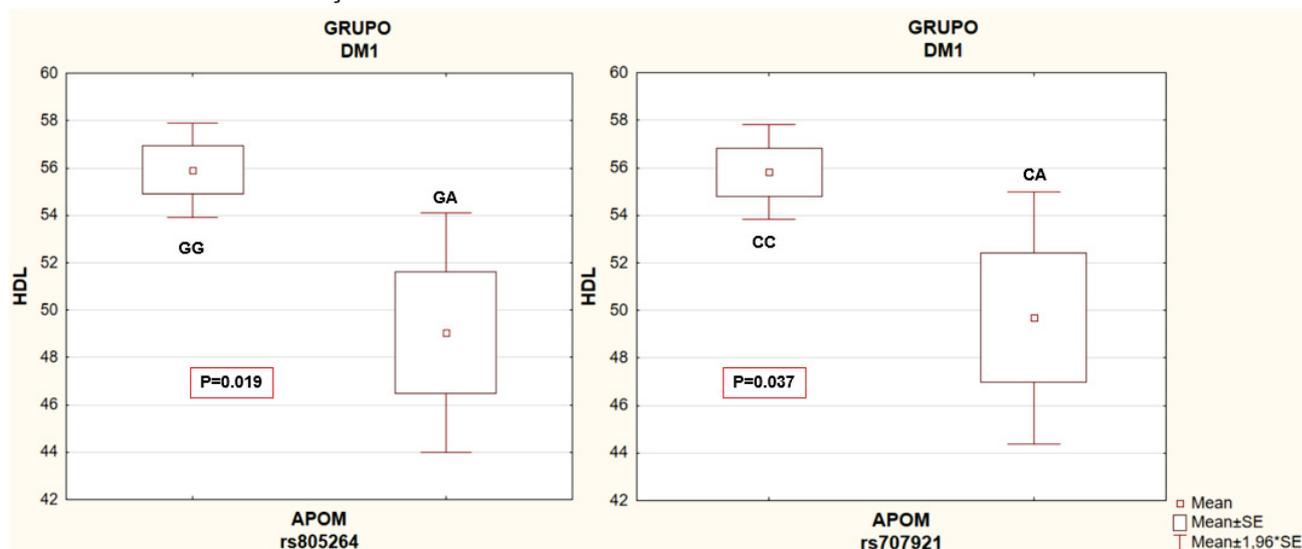
A concentração do HDL-colesterol, é apresentada como média, 1-desvio padrão (quadrado) e 2-desvios padrão (barras verticais). P, probabilidade teste t-Student bidirecional. $P < 0,05$ considerado significativo, destacado em negrito. P: probabilidade. $P < 0,05$ é significativo. FONTE: O autor, 2021.

A correlação positiva entre os polimorfismos rs805264 e rs707921 com as concentrações plasmáticas de HDL-C, embora seja fraca ($r=0.019$ e $P=0.017$; $r=0.1632$ e $P=0.037$) (FIGURA 31), está em concordância com dados da literatura que mostram que a expressão do gene *APOM* está ligada as concentrações de HDL-C. A apoM está positivamente associada com HDL-C e LDL-C (AXLER; AHNSTROM; DAHLBACK, 2007).

O polimorfismo rs707921 ao aumento do HDL em mulheres chinesas Han (AUNG *et al.*, 2013). Como os polimorfismos rs805264 e rs707921 estão em desequilíbrio de ligação (DL) (DU *et al.*, 2017), faz sentido apresentarem os mesmos efeitos com relação as concentrações plasmáticas de HDL-C.

Aung e colaboradores (2013) evidenciaram a diferença da frequência dos genótipos do polimorfismo rs707921, localizado no éxon 5 do gene *APOM*, entre as populações Han e Mulao (China), onde mostraram que indivíduos Mulao, portadores do alelo A apresentavam concentrações mais altas de TG e de HDL que indivíduos Han que não apresentavam o alelo A em seu genótipo.

FIGURA 32. ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs707921 E rs805264 DO GENE *APOM* COM AS CONCENTRAÇÕES DE HDL PARA O GRUPO DM1.



A concentração do HDL-colesterol, é apresentada como média, 1-desvio padrão (quadrado) e 2-desvios padrão (barras verticais). P, probabilidade teste t-Student bidirecional. $P < 0,05$ considerado significativo, destacado em negrito. P: probabilidade. $P < 0,05$ é significativo. FONTE: O autor, 2021.

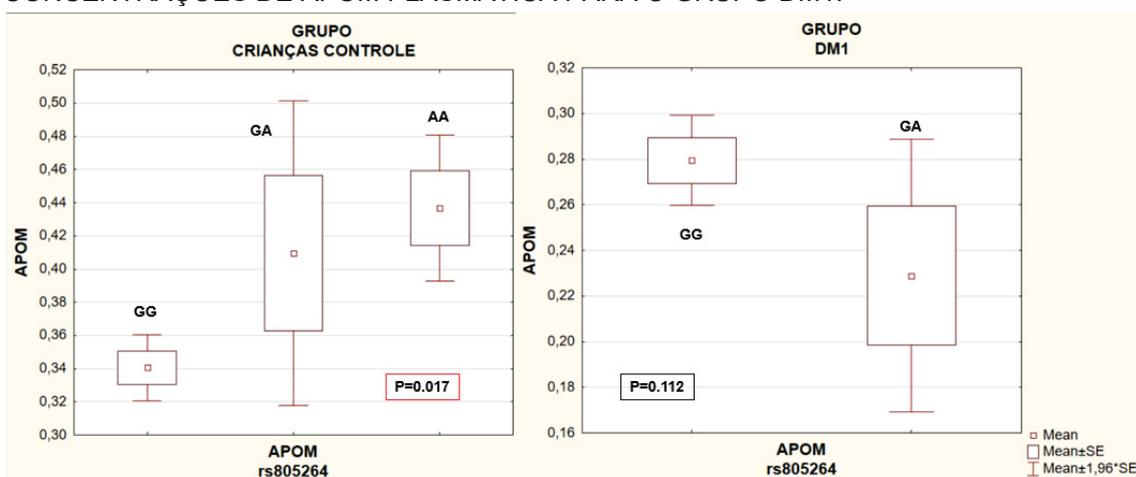
Zheng e colaboradores [Zheng, 2014 #8793] reportaram a ativação do promotor de *APOM* com diferentes polimorfismos “selvagens” (rs9404941 e C-724del), e uma diminuição significativa nos rs9404941-C e -724del das atividades da luciferase ($P=0.012$ e $P = 0.009$, respectivamente), indicando que essas variantes podem suprimir a expressão da *APOM*.

Outro dado interessante desse estudo, é que os indivíduos portadores dessas variantes apresentaram maiores concentrações de colesterol total, quando comparados aos indivíduos portadores dos polimorfismos “selvagens”, sugerindo fortemente que essas alterações gênicas na região promotora podem influenciar o metabolismo de HDL *in vivo*, regulando negativamente a expressão de *APOM*. Embora não tenhamos encontrado correlações significativas entre o rs805264 e rs707921 do gene *APOM* com o colesterol total, os indivíduos com DM1 174,9 mg/dL (147,0–196,0) desse estudo, apresentaram maiores valores de mediana quando comparados aos controles 148,5 mg/dL (128,0–168,0), respectivamente.

Em humanos, as concentrações plasmáticas de apoM são aproximadamente 1 μM , segundo Ren e colaboradores (2015). Nesse estudo encontramos para o grupo controle uma média de $2.46 \pm 0.97 \mu\text{mol/L}$ e no grupo

com DM1 uma concentração de $1.88 \pm 0.97 \mu\text{mol/L}$, evidenciando também uma fraca correlação entre o polimorfismo rs805264 com a *APOM* plasmática ($r=0.2211$ e $P=0.017$) no grupo controle (FIGURA 32). No grupo DM1, o valor negativo de r (-0.1471), está de acordo com o reportado por Richter e colaboradores (2003), que descreveram concentrações de apoM diminuídas em pacientes com DM, propondo que essa redução estaria ligada ao estado de hiperglicemia.

FIGURA 33. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs805264 DO GENE *APOM* COM AS CONCENTRAÇÕES DE *APOM* PLASMÁTICA PARA O GRUPO DM1.



A concentração da apoM plasmática é apresentada como média, 1-desvio padrão (quadrado) e 2-desvios padrão (barras verticais). P, probabilidade teste t-Student bidirecional. $P < 0,05$ considerado significativo, destacado em negro. P: probabilidade. $P < 0,05$ é significativo.

FONTE: O autor, 2021.

A apoM é predominantemente presente em partículas de lipoproteína de alta densidade (HDL) [Zhang, 2007 #9050], e já foi demonstrado que a apoM é necessária para a pré- β -Formação de HDL e o efluxo de colesterol para HDL, sugerindo um efeito protetor dessa partícula contra aterosclerose (WOLFRUM; POY; STOFFEL, 2005).

Assim, apesar das indicações de que apoM afeta a formação pré- β -HDL e a capacidade de HDL para mediar o efluxo de colesterol das células e proteger contra a oxidação, o impacto do apoM no sistema cardiovascular humano ainda necessita elucidação.

Uma discussão interessante de se ter, ainda ligada a apoM, é a respeito do gene *HNF1 α* , um gene que codifica um fator de transcrição o qual regula a expressão do gene *APOM*. Já foi relatada que alterações polimórficas nesse fator

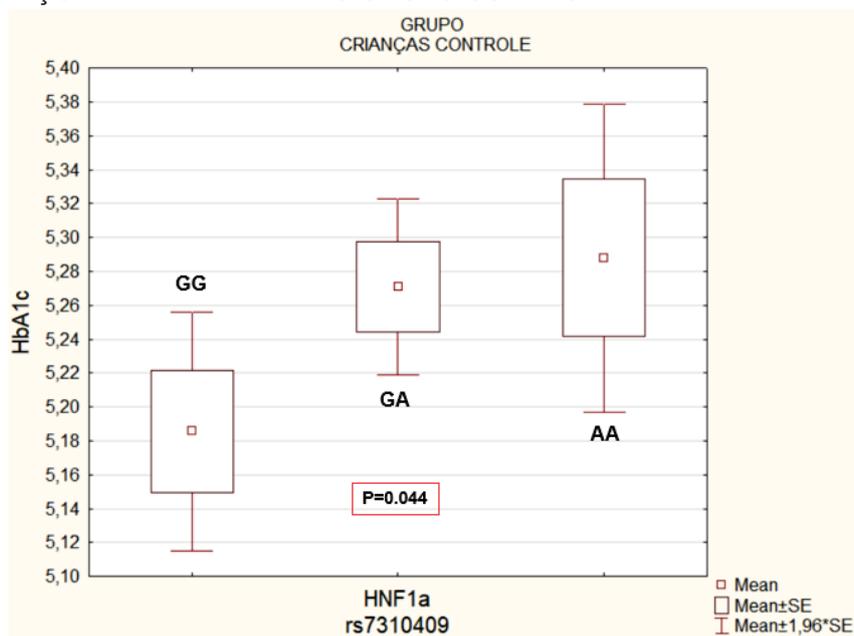
de transcrição em humanos provoca MODY3, caracterizado por um defeito grave a secreção de insulina em resposta à glicose (PONTOGLIO, 2000; GIUFFRIDA; REIS, 2005), e as concentrações de HDL são ligeiramente mais baixos em pacientes MODY3 (ISOMAA *et al.*, 1998), quando comparadas ao DM2, bem como os indivíduos MODY3 tiveram aproximadamente 36% de redução na concentração plasmática de apoM (RICHTER, S. *et al.*, 2003), desse modo Nielsen e colaboradores (NIELSEN *et al.*, 2009) [Nielsen, 2009 #9051], sugerem que a apoM poderia ser um biomarcador para identificação de pacientes MODY3.

O rs7310409, do gene *HNF1A*, apresentou correlação positiva com a hemoglobina glicada no grupo controle ($r=0.1556$ e $P=0.044$) (FIGURA 33). Polimorfismos no gene *HNF1A* foram relacionados com resistência à insulina (CHIU *et al.*, 2000).

A secreção de insulina em resposta aos nutrientes, diminuição da proliferação das células β e estrutura anormal das ilhotas de Langerhans ocorrem quando a produção de HNF1 α é insuficiente. A detecção prejudicada da glicose pelas células β é provavelmente o resultado da redução da glicólise aeróbica e metabolismo mitocondrial (BYRNE *et al.*, 1996; DUKES *et al.*, 1998; PONTOGLIO *et al.*, 1998).

É possível propor como hipótese para esse resultado, que o alelo A do polimorfismo rs7310409 (G>A), melhore os valores do biomarcador HbA1c no grupo controle, pelo melhor perfil metabólico atrelado a resposta da insulina frente a glicose nesses indivíduos, sendo esse mecanismo disfuncional no grupo DM1.

FIGURA 34. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs7310409 DO GENE *HNF1A* COM AS CONCENTRAÇÕES DE HbA1c PARA O GRUPO CONTROLE.



Valores de HbA1c é apresentada como média, 1-desvio padrão (quadrado) e 2-desvios padrão (barras verticais). P, probabilidade teste t-Student bidirecional. $P < 0,05$ considerado significativo, destacado em negrito. P: probabilidade. $P < 0,05$ é significativo.

FONTE: O autor, 2021.

Esse estudo, não encontrou associações relevante poder estatístico dos polimorfismos rs4880 (*SOD2*), rs17576 (*MMP9*), rs5128 e rs2542052 (*APOC3*) com marcadores bioquímicos. Hipoteticamente dois fatores principais podem ter afetado determinadas análises, sendo uma delas o tamanho amostral, relativamente pequeno, embora suficiente para estudo prospectivo, e a baixa frequência do MAF em nossa população, o que afeta o poder de cálculo.

5 CONCLUSÕES

- O polimorfismo rs2542052 do gene *APOC3* foi associado ao DM1 nesse estudo, nos modelos codominante, dominante e recessivo ($P < 0,001$, $P = 0,009$ e $P < 0,001$, respectivamente), tendo o alelo A caráter de risco aumentado para o desenvolvimento da doença.
- Os polimorfismos rs4880 (*SOD2*), rs3757247 (*BACH2*), rs805264 e rs707921 (*APOM*), rs5128 (*APOC3*), rs17576 (*MMP9*) e 7310409 (*HNF1A*), não foram associados ao DM1 nessa população.

- Com exceção do rs2542052, as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos em estudo (rs4880, rs3757247, rs805264, rs707921, rs5128 e rs7310409) foram similares às de outras populações caucasianas.
- As análises de correlação encontradas entre os polimorfismos rs3757247 (*BACH2*), rs805264, rs707921 (*APOM*) e rs7310409 (*HNF1A*) com determinados marcadores bioquímicos (HDL-c, apoM sérica, proteína total e HbA1c) foram estatisticamente fracas, sendo possivelmente ao acaso.
- A apoM sérica teve diferença estatística entre os grupos, com concentrações menores entre os indivíduos com DM1 ($1.88 \pm 0.74 \mu\text{M/L}$) DM1 em comparação ao grupo controle ($2.46 \pm 0.97 \mu\text{M/L}$) estando de acordo com o encontrado na literatura.
- Não há um consenso sobre os mecanismos e uma função estabelecida envolvendo S1P, apoM e HDL-c, desse modo, os estudos envolvendo essas moléculas devem ser continuados, na tentativa de elucidação.
- A MMP-9 sérica não foi diferente estatisticamente entre os grupos, apresentando valores similares ao descrito em publicações anteriores à essa.
- Não há um valor de referência estabelecido para o biomarcado MMP-9, ficando aberta possibilidade para novos ensaios para atender essa expectativa, ao menos para a população sul-brasileira.

REFERÊNCIAS

- 1000GENOMES. **Reference SNP (rs) Report**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3757247?vertical_tab=true#frequency_tab>. Acesso em: 08/02.
- 1000GENOMES. **Reference SNP (rs) Report - rs17576**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs17576?vertical_tab=true#frequency_tab>. Acesso em: 11/17.
- 1000GENOMES. **Reference SNP (rs) Report - rs805264**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs805264?vertical_tab=true#frequency_tab>. Acesso em: 02/08.
- 1000GENOMES. **Reference SNP (rs) Report - rs2542052**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2542052?vertical_tab=true#frequency_tab>. Acesso em: 15/11.
- AALTO-SETALA, K. *et al.* Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. **J Clin Invest**. v. 90, n.5, p. 1889-900. 1992.
- ADA. Standards of medical care in diabetes--2014. **Diabetes Care**. v. 37 Suppl 1, p. S14-80. 2014.
- ADA. Classification and diagnosis of diabetes. Sec. 2. In Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**. v. 38(Suppl. 1):, p. S8–S16 2015.
- ADA. Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2017. **Diabetes Care**. v. 41, n.5, p. 917-928. 2018.
- ADA. Standards of Medical Care in Diabetes -2021. **Diabetes Care**. v. 44, n.Suppl 1, p. 244. 2021.
- AFFARA, M. *et al.* Understanding endothelial cell apoptosis: what can the transcriptome, glycome and proteome reveal? **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. v. 362, n.1484, p. 1469-87. 2007.
- AGGARWAL, D. J.; KATHARIYA, M. G.; VERMA, D. P. K. LDL-C, NON-HDL-C and APO-B for cardiovascular risk assessment: Looking for the ideal marker. **Indian Heart J**. v. 73, n.5, p. 544-548. 2021.
- AHLUWALIA, T. S. *et al.* Common variants of inflammatory cytokine genes are associated with risk of nephropathy in type 2 diabetes among Asian Indians. **PLoS One**. v. 4, n.4, p. e5168. 2009.
- AHNSTRÖM, J. **Apolipoprotein M – Studies of Structure and Function**. 120 f. - Department of Clinical Chemistry, Lund University, 2009.

AHNSTROM, J. *et al.* Levels of apolipoprotein M are not associated with the risk of coronary heart disease in two independent case-control studies. **J Lipid Res.** v. 49, n.9, p. 1912-7. 2008.

AHNSTROM, J. *et al.* Hydrophobic ligand binding properties of the human lipocalin apolipoprotein M. **J Lipid Res.** v. 48, n.8, p. 1754-62. 2007.

AHNSTROM, J. *et al.* Plasma concentrations of apolipoproteins A-I, B, and M in patients with critical limb ischemia. **Clin Biochem.** v. 43, n.6, p. 599-603. 2010.

AIMES, R. T.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. **J Biol Chem.** v. 270, n.11, p. 5872-6. 1995.

AKASHI, M. *et al.* Irradiation increases manganese superoxide dismutase mRNA levels in human fibroblasts. Possible mechanisms for its accumulation. **J Biol Chem.** v. 270, n.26, p. 15864-9. 1995.

ALAUPOVIC, P. *et al.* Identification of apoB-containing lipoprotein families in NIDDM. **Diabetes.** v. 41 Suppl 2, p. 18-25. 1992.

ALBAGLI, O. *et al.* The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. **Cell Growth Differ.** v. 6, n.9, p. 1193-8. 1995.

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.

ALBERT, C. *et al.* Cubilin Single Nucleotide Polymorphism Variants are Associated with Macroangiopathy While a Matrix Metalloproteinase-9 Single Nucleotide Polymorphism Flip-Flop may Indicate Susceptibility of Diabetic Nephropathy in Type-2 Diabetic Patients. **Nephron.** v. 141, n.3, p. 156-165. 2019.

ALHARBI, K. K. *et al.* Apolipoprotein C3 Gene Variants and Risk of Developing Type 2 Diabetes in Saudi Subjects. **Metab Syndr Relat Disord.** v. 13, n.7, p. 298-303. 2015.

ALONSO, G. T. *et al.* Diabetic Ketoacidosis at Diagnosis of Type 1 Diabetes in Colorado Children, 2010-2017. **Diabetes Care.** v. 43, n.1, p. 117-121. 2020.

AMALINEI, C. *et al.* Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. **Rom J Morphol Embryol.** v. 51, n.2, p. 215-28. 2010.

AMOUTZIAS, G. D. *et al.* One billion years of bZIP transcription factor evolution: conservation and change in dimerization and DNA-binding site specificity. **Mol Biol Evol.** v. 24, n.3, p. 827-35. 2007.

ANDRADE, V. L. *et al.* Functional polymorphism located in MMP-9 gene promoter is strongly associated with obesity. **DNA Cell Biol.** v. 31, n.6, p. 1054-7. 2012.

ANIK, A. *et al.* Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. **J Pediatr Endocrinol Metab.** v. 28, n.3-4, p. 251-63. 2015.

ARLT, O. *et al.* Sphingosine-1-phosphate modulates dendritic cell function: focus on non-migratory effects in vitro and in vivo. **Cell Physiol Biochem.** v. 34, n.1, p. 27-44. 2014.

ARMENDARIZ, A. D.; KRAUSS, R. M. Hepatic nuclear factor 1-alpha: inflammation, genetics, and atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol.** v. 20, n.2, p. 106-11. 2009.

ARUMUGAM, T. *et al.* Fumonisin B1-induced oxidative stress triggers Nrf2-mediated antioxidant response in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. **Mycotoxin Res.** v. 35, n.1, p. 99-109. 2019.

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

ATZMON, G. *et al.* Lipoprotein genotype and conserved pathway for exceptional longevity in humans. **PLoS Biol.** v. 4, n.4, p. e113. 2006.

AU, A. *et al.* The impact of APOA5, APOB, APOC3 and ABCA1 gene polymorphisms on ischemic stroke: Evidence from a meta-analysis. **Atherosclerosis.** v. 265, p. 60-70. 2017.

AUNG, L. H. *et al.* Association of the apolipoprotein M gene polymorphisms and serum lipid levels. **Mol Biol Rep.** v. 40, n.2, p. 1843-53. 2013.

AXLER, O.; AHNSTROM, J.; DAHLBACK, B. An ELISA for apolipoprotein M reveals a strong correlation to total cholesterol in human plasma. **J Lipid Res.** v. 48, n.8, p. 1772-80. 2007.

AYABE, T. *et al.* Variants associated with autoimmune Type 1 diabetes in Japanese children: implications for age-specific effects of cis-regulatory haplotypes at 17q12-q21. **Diabet Med.** v. 33, n.12, p. 1717-1722. 2016.

BACH, I. *et al.* Cloning of human hepatic nuclear factor 1 (HNF1) and chromosomal localization of its gene in man and mouse. **Genomics.** v. 8, n.1, p. 155-64. 1990.

BAKAY, M. *et al.* The Genetic Contribution to Type 1 Diabetes. **Curr Diab Rep.** v. 19, n.11, p. 116. 2019.

BALASUBRAMANYAM, A. Defining and Classifying New Subgroups of Diabetes. **Annu Rev Med.** v. 72, p. 63-74. 2021.

BANDEGI, A. R. *et al.* SstI Polymorphism of the Apolipoprotein CIII Gene in Iranian Hyperlipidemic Patients: A Study in Semnan Province. **Iran J Basic Med Sci.** v. 14, n.6, p. 506-13. 2011.

BARRETT, J. C. *et al.* Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. **Nat Genet.** v. 41, p. 703. 2009.

BARZI, S. A.; GHADERIAN, S. M.; NOORMOHAMMADI, Z. A molecular case-control study of association of HNF1A gene polymorphisms (rs2259816 and rs7310409) with risk of coronary artery disease in Iranian patients. **Hum Antibodies.** v. 25, n.1-2, p. 65-70. 2017.

BASU, A. *et al.* Serum apolipoproteins and apolipoprotein-defined lipoprotein subclasses: a hypothesis-generating prospective study of cardiovascular events in T1D. **J Lipid Res.** v. 60, n.8, p. 1432-1439. 2019.

BASU, A. *et al.* Apolipoprotein-defined lipoprotein subclasses, serum apolipoproteins, and carotid intima-media thickness in T1D. **J Lipid Res.** v. 59, n.5, p. 872-883. 2018.

BEBU, I. *et al.* Genetic Risk Factors for CVD in Type 1 Diabetes: The DCCT/EDIC Study. **Diabetes Care.** v. 44, n.6, p. 1309-1316. 2021.

BEISIEGEL, U. Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. **Curr Opin Lipidol.** v. 6, n.3, p. 117-22. 1995.

BEISIEGEL, U. Lipoprotein metabolism. **Eur Heart J.** v. 19 Suppl A, p. A20-3. 1998.

BELL, G. I.; HORITA, S.; KARAM, J. H. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes.** v. 33, n.2, p. 176-83. 1984.

BELLANNE-CHANTELOT, C. *et al.* The type and the position of HNF1A mutation modulate age at diagnosis of diabetes in patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY)-3. **Diabetes.** v. 57, n.2, p. 503-8. 2008.

BENTLEY, A. R. *et al.* Multi-ancestry genome-wide gene-smoking interaction study of 387,272 individuals identifies new loci associated with serum lipids. **Nat Genet.** v. 51, n.4, p. 636-648. 2019.

BERBEE, J. F.; HAVEKES, L. M.; RENSEN, P. C. Apolipoproteins modulate the inflammatory response to lipopolysaccharide. **J Endotoxin Res.** v. 11, n.2, p. 97-103. 2005.

BERG, L. P. *et al.* Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 1 in the protein C gene promoter is associated with hereditary thrombophilia. **Hum Mol Genet.** v. 3, n.12, p. 2147-52. 1994.

BERGHOLDT, R. *et al.* Identification of novel type 1 diabetes candidate genes by integrating genome-wide association data, protein-protein interactions, and human pancreatic islet gene expression. **Diabetes.** v. 61, n.4, p. 954-62. 2012.

BIRKEDAL-HANSEN, H. *et al.* Matrix metalloproteinases: a review. **Crit Rev Oral Biol Med.** v. 4, n.2, p. 197-250. 1993.

BISGAARD, L. S.; CHRISTOFFERSEN, C. Apolipoprotein M/sphingosine-1-phosphate: novel effects on lipids, inflammation and kidney biology. **Curr Opin Lipidol.** v. 30, n.3, p. 212-217. 2019.

BISGAARD, L. S.; CHRISTOFFERSEN, C. The apoM/S1P Complex-A Mediator in Kidney Biology and Disease? **Front Med (Lausanne).** v. 8, p. 754490. 2021.

BISHAY, R. H.; GREENFIELD, J. R. A review of maturity onset diabetes of the young (MODY) and challenges in the management of glucokinase-MODY. **Med J Aust.** v. 205, n.10, p. 480-485. 2016.

BJORNSTAD, P. *et al.* Serum uric acid predicts vascular complications in adults with type 1 diabetes: the coronary artery calcification in type 1 diabetes study. **Acta Diabetol.** v. 51, n.5, p. 783-91. 2014.

BLACKETT, P. *et al.* Plasma apolipoprotein C-III levels in children with type I diabetes. **South Med J.** v. 81, n.4, p. 469-73. 1988.

BLACKETT, P. R. *et al.* ApoC-III bound to apoB-containing lipoproteins increase with insulin resistance in Cherokee Indian youth. **Metabolism.** v. 54, n.2, p. 180-7. 2005.

BLAHO, V. A.; HLA, T. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. **J Lipid Res.** v. 55, n.8, p. 1596-608. 2014.

BLUTEAU, O. *et al.* Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. **Nat Genet.** v. 32, n.2, p. 312-5. 2002.

BODE, C. *et al.* Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. **J Cell Biochem.** v. 109, n.6, p. 1232-43. 2010.

BOMBELI, T. *et al.* Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. **Blood.** v. 89, n.7, p. 2429-42. 1997.

BOREN, J.; WILLIAMS, K. J. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. **Curr Opin Lipidol.** v. 27, n.5, p. 473-83. 2016.

BORGSTAHL, G. E. *et al.* The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. **Cell.** v. 71, n.1, p. 107-18. 1992.

BOSI, P. L. *et al.* [Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance in the urban population of 30 to 79 years of the city of Sao Carlos, Sao Paulo]. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** v. 53, n.6, p. 726-32. 2009.

BOSSE, Y. *et al.* Genome-wide linkage scan reveals multiple susceptibility loci influencing lipid and lipoprotein levels in the Quebec Family Study. **J Lipid Res.** v. 45, n.3, p. 419-26. 2004.

BOYER, P. D. The ATP synthase--a splendid molecular machine. **Annu Rev Biochem.** v. 66, p. 717-49. 1997.

BRINCK, J. W. *et al.* High-density lipoprotein from end-stage renal disease patients exhibits superior cardioprotection and increase in sphingosine-1-phosphate. **Eur J Clin Invest.** v. 48, n.2, p. 2018.

BRUCE, C. R. *et al.* Overexpression of sphingosine kinase 1 prevents ceramide accumulation and ameliorates muscle insulin resistance in high-fat diet-fed mice. **Diabetes.** v. 61, n.12, p. 3148-55. 2012.

BRUCE, C. R. *et al.* The sphingosine-1-phosphate analog FTY720 reduces muscle ceramide content and improves glucose tolerance in high fat-fed male mice. **Endocrinology.** v. 154, n.1, p. 65-76. 2013.

BRUNKHORST, R.; VUTUKURI, R.; PFEILSCHIFTER, W. Fingolimod for the treatment of neurological diseases-state of play and future perspectives. **Front Cell Neurosci.** v. 8, p. 283. 2014.

BULUT, T.; DEMIREL, F.; METIN, A. The prevalence of dyslipidemia and associated factors in children and adolescents with type 1 diabetes. **J Pediatr Endocrinol Metab.** v. 30, n.2, p. 181-187. 2017.

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. **Circulation.** v. 115, n.1, p. 114-26. 2007.

BYRNE, M. M. *et al.* Altered insulin secretory responses to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12. **Diabetes.** v. 45, n.11, p. 1503-10. 1996.

CABRAL-PACHECO, G. A. *et al.* The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. **Int J Mol Sci.** v. 21, n.24, p. 2020.

CAI, H. *et al.* Apolipoprotein M, identified as a novel hepatitis C virus (HCV) particle associated protein, contributes to HCV assembly and interacts with E2 protein. **Antiviral Res.** v. 177, p. 104756. 2020.

CALAYIR, E. *et al.* LXR-agonists regulate ApoM expression differentially in liver and intestine. **Curr Pharm Biotechnol.** v. 9, n.6, p. 516-21. 2008.

CAMATO, R. *et al.* Protein polymorphism of a human plasma apolipoprotein D antigenic epitope. **J Lipid Res.** v. 30, n.6, p. 865-75. 1989.

CAMPOS, J. J. *et al.* Incidência de diabetes mellitus insulino-dependente (tipo 1) na cidade de Londrina, PR, Brasil. . **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. n.42, p. 36-44. 1998.

CANDAS, D. *et al.* CyclinB1/Cdk1 phosphorylates mitochondrial antioxidant MnSOD in cell adaptive response to radiation stress. **J Mol Cell Biol.** v. 5, n.3, p. 166-75. 2013.

CANTRELL STANFORD, J. *et al.* Sphingosine 1-phosphate (S1P) regulates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. **J Biol Chem.** v. 287, n.16, p. 13457-64. 2012.

CARON, S. *et al.* Transcriptional activation of apolipoprotein CIII expression by glucose may contribute to diabetic dyslipidemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 31, n.3, p. 513-9. 2011.

CARTWRIGHT, T. A. *et al.* Mrp1 is essential for sphingolipid signaling to p-glycoprotein in mouse blood-brain and blood-spinal cord barriers. **J Cereb Blood Flow Metab.** v. 33, n.3, p. 381-8. 2013.

CATAPANO, A. L. The distribution of apo C-II and apo C-III in very low density lipoproteins of normal and type IV subjects. **Atherosclerosis.** v. 35, n.4, p. 419-24. 1980.

CERIOTTI, F. *et al.* Reference intervals for serum creatinine concentrations: assessment of available data for global application. **Clin Chem.** v. 54, n.3, p. 559-66. 2008.

CEROLSALETTI, K.; HAO, W.; GREENBAUM, C. J. Genetics Coming of Age in Type 1 Diabetes. **Diabetes Care.** v. 42, n.2, p. 189-191. 2019.

CHAN, D. C. *et al.* Apolipoproteins C-III and A-V as predictors of very-low-density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein B-100 kinetics. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 26, n.3, p. 590-6. 2006.

CHARLES, M. A.; KANE, J. P. New molecular insights into CETP structure and function: a review. **J Lipid Res.** v. 53, n.8, p. 1451-8. 2012.

CHEN, M. *et al.* Transcriptional regulation of the apoC-III gene by insulin in diabetic mice: correlation with changes in plasma triglyceride levels. **J Lipid Res.** v. 35, n.11, p. 1918-24. 1994.

CHEN, Y. *et al.* Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS. **EMBO Rep.** v. 12, n.6, p. 534-41. 2011.

CHENG, G.; ZHENG, L. Regulation of the apolipoprotein M signaling pathway: a review. **J Recept Signal Transduct Res.** v. p. 1-8. 2021.

CHERUBINI, V. *et al.* Temporal trends in diabetic ketoacidosis at diagnosis of paediatric type 1 diabetes between 2006 and 2016: results from 13 countries in three continents. **Diabetologia.** v. 63, n.8, p. 1530-1541. 2020.

CHIARELLI, F.; GIANNINI, C.; PRIMAVERA, M. Prediction and prevention of type 1 diabetes in children. **Clin Pediatr Endocrinol.** v. 28, n.3, p. 43-57. 2019.

CHIESA, S. T. *et al.* Elevated high-density lipoprotein in adolescents with Type 1 diabetes is associated with endothelial dysfunction in the presence of systemic inflammation. **Eur Heart J.** v. 40, n.43, p. 3559-3566. 2019.

CHIRICO, E. N.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB Life**. v. 64, n.1, p. 72-80. 2012.

CHISTIYAKOV, D. A. *et al.* The 262T>C promoter polymorphism of the catalase gene is associated with diabetic neuropathy in type 1 diabetic Russian patients. **Diabetes Metab**. v. 32, n.1, p. 63-8. 2006.

CHISTYAKOV, D. A. *et al.* Polymorphisms in the Mn-SOD and EC-SOD genes and their relationship to diabetic neuropathy in type 1 diabetes mellitus. **BMC Med Genet**. v. 2, p. 4. 2001.

CHIU, K. C. *et al.* The I27L amino acid polymorphism of hepatic nuclear factor-1alpha is associated with insulin resistance. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 85, n.6, p. 2178-83. 2000.

CHO, K. H. Synthesis of reconstituted high density lipoprotein (rHDL) containing apoA-I and apoC-III: the functional role of apoC-III in rHDL. **Mol Cells**. v. 27, n.3, p. 291-7. 2009.

CHRISTENSEN, J.; SHASTRI, V. P. Matrix-metalloproteinase-9 is cleaved and activated by cathepsin K. **BMC Res Notes**. v. 8, p. 322. 2015.

CHRISTOFFERSEN, C. Apolipoprotein M-A Marker or an Active Player in Type II Diabetes? **Front Endocrinol (Lausanne)**. v. 12, p. 665393. 2021.

CHRISTOFFERSEN, C. *et al.* The signal peptide anchors apolipoprotein M in plasma lipoproteins and prevents rapid clearance of apolipoprotein M from plasma. **J Biol Chem**. v. 283, n.27, p. 18765-72. 2008.

CHRISTOFFERSEN, C. *et al.* The plasma concentration of HDL-associated apoM is influenced by LDL receptor-mediated clearance of apoB-containing particles. **J Lipid Res**. v. 53, n.10, p. 2198-2204. 2012.

CHRISTOFFERSEN, C. *et al.* The Apolipoprotein M/S1P Axis Controls Triglyceride Metabolism and Brown Fat Activity. **Cell Rep**. v. 22, n.1, p. 175-188. 2018.

CHRISTOFFERSEN, C. *et al.* Effect of apolipoprotein M on high density lipoprotein metabolism and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knock-out mice. **J Biol Chem**. v. 283, n.4, p. 1839-47. 2008.

CHRISTOFFERSEN, C. *et al.* Isolation and characterization of human apolipoprotein M-containing lipoproteins. **J Lipid Res**. v. 47, n.8, p. 1833-43. 2006.

CHRISTOFFERSEN, C. *et al.* Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 108, n.23, p. 9613-8. 2011.

CHRISTOFFERSEN, C. *et al.* Opposing effects of apolipoprotein m on catabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins and atherosclerosis. **Circ Res**. v. 106, n.10, p. 1624-34. 2010.

CLAUDEL, T. *et al.* Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression. **Gastroenterology**. v. 125, n.2, p. 544-55. 2003.

CLAVEY, V. *et al.* Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII, and E. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 15, n.7, p. 963-71. 1995.

CLEMENTE-POSTIGO, M. *et al.* Effect of apolipoprotein C3 and apolipoprotein A1 polymorphisms on postprandial response to a fat overload in metabolic syndrome patients. **Clin Biochem**. v. 43, n.16-17, p. 1300-4. 2010.

COBAS, R. A. *et al.* The cost of type 1 diabetes: a nationwide multicentre study in Brazil. **Bull World Health Organ**. v. 91, n.6, p. 434-40. 2013.

COHEN, J. C.; STENDER, S.; HOBBS, H. H. APOC3, coronary disease, and complexities of Mendelian randomization. **Cell Metab**. v. 20, n.3, p. 387-9. 2014.

COHN, J. S. *et al.* Rate of production of plasma and very-low-density lipoprotein (VLDL) apolipoprotein C-III is strongly related to the concentration and level of production of VLDL triglyceride in male subjects with different body weights and levels of insulin sensitivity. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 89, n.8, p. 3949-55. 2004.

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.

COLLI, M. L. *et al.* An integrated multi-omics approach identifies the landscape of interferon-alpha-mediated responses of human pancreatic beta cells. **Nat Commun**. v. 11, n.1, p. 2584. 2020.

CONSORTIUM, S. T. D. *et al.* Association of a low-frequency variant in HNF1A with type 2 diabetes in a Latino population. **JAMA**. v. 311, n.22, p. 2305-14. 2014.

COOMANS DE BRACHENE, A. *et al.* Preclinical evaluation of tyrosine kinase 2 inhibitors for human beta-cell protection in type 1 diabetes. **Diabetes Obes Metab**. v. 22, n.10, p. 1827-1836. 2020.

COOPER, J. D. *et al.* Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. **Nat Genet**. v. 40, n.12, p. 1399-401. 2008.

CORRADIN, O. *et al.* Combinatorial effects of multiple enhancer variants in linkage disequilibrium dictate levels of gene expression to confer susceptibility to common traits. **Genome Res**. v. 24, n.1, p. 1-13. 2014.

COSTA, C. D. *et al.* Association of Polymorphism rs17576 of the Metalloproteinase 9 Gene with Gestational Diabetes in Euro-Brazilian Pregnant Women. **Clin Lab.** v. 64, n.4, p. 645-649. 2018.

COSTA, R. H. *et al.* Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. **Hepatology.** v. 38, n.6, p. 1331-47. 2003.

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 Suppl 20, p. 4-17. 2014.

CRUZ, I. B. M. *et al.* The antioxidant effect of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) is influenced by a genetic superoxide-hydrogen peroxide imbalance in healthy humans. **Journal of Nutritional Health & Food Engineering.** v. 8, n.3, p. 2018.

CUCHEL, M.; RADER, D. J. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? **Circulation.** v. 113, n.21, p. 2548-55. 2006.

CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. **Prog Mol Biol Transl Sci.** v. 147, p. 1-73. 2017.

CURTISS, L. K. *et al.* What is so special about apolipoprotein AI in reverse cholesterol transport? **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 26, n.1, p. 12-9. 2006.

CYSTER, J. G.; SCHWAB, S. R. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. **Annu Rev Immunol.** v. 30, p. 69-94. 2012.

D'ANGELO, A. *et al.* Hepatocyte nuclear factor 1alpha and beta control terminal differentiation and cell fate commitment in the gut epithelium. **Development.** v. 137, n.9, p. 1573-82. 2010.

DAHLBACK, B.; NIELSEN, L. B. Apolipoprotein M--a novel player in high-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol.** v. 17, n.3, p. 291-5. 2006.

DALE, M. A. *et al.* Background differences in baseline and stimulated MMP levels influence abdominal aortic aneurysm susceptibility. **Atherosclerosis.** v. 243, n.2, p. 621-9. 2015.

DAVIDSON, M. *et al.* Measurement of LDL-C after treatment with the CETP inhibitor anacetrapib. **J Lipid Res.** v. 54, n.2, p. 467-72. 2013.

DAVIDSSON, P. *et al.* A proteomic study of the apolipoproteins in LDL subclasses in patients with the metabolic syndrome and type 2 diabetes. **J Lipid Res.** v. 46, n.9, p. 1999-2006. 2005.

DAVISON, K. A. *et al.* Relationship between adherence to diet, glycemic control and cardiovascular risk factors in patients with type 1 diabetes: a nationwide survey in Brazil. **Nutr J.** v. 13, p. 19. 2014.

DE, B. S. *et al.* Oxidative stress as an underlying contributor in the development of chronic complications in diabetes mellitus. **Int J Mol Sci.** v. 14, n.2, p. 3265-84. 2013.

DE GRAAFF, L. C. *et al.* Long-term follow-up of organ-specific antibodies and related organ dysfunction in type 1 diabetes mellitus. **Neth J Med.** v. 69, n.2, p. 66-71. 2011.

DE SILVA, H. V. *et al.* Overexpression of human apolipoprotein C-III in transgenic mice results in an accumulation of apolipoprotein B48 remnants that is corrected by excess apolipoprotein E. **J Biol Chem.** v. 269, n.3, p. 2324-35. 1994.

DE VAS, M. G. *et al.* Hnf1b controls pancreas morphogenesis and the generation of Ngn3+ endocrine progenitors. **Development.** v. 142, n.5, p. 871-82. 2015.

DEFRONZO, R. A.; HENDLER, R.; SIMONSON, D. Insulin resistance is a prominent feature of insulin-dependent diabetes. **Diabetes.** v. 31, n.9, p. 795-801. 1982.

DEL CASTILLO-OLIVARES, A.; GIL, G. Alpha 1-fetoprotein transcription factor is required for the expression of sterol 12alpha -hydroxylase, the specific enzyme for cholic acid synthesis. Potential role in the bile acid-mediated regulation of gene transcription. **J Biol Chem.** v. 275, n.23, p. 17793-9. 2000.

DELGADO-LISTA, J. *et al.* Effects of variations in the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster on different parameters of postprandial lipid metabolism in healthy young men. **J Lipid Res.** v. 51, n.1, p. 63-73. 2010.

DEMIREL, F. *et al.* Microvascular complications in adolescents with type 1 diabetes mellitus. **J Clin Res Pediatr Endocrinol.** v. 5, n.3, p. 145-9. 2013.

DEROSA, G. *et al.* Matrix metalloproteinase 2 may be a marker of microangiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 70, n.2, p. 119-25. 2005.

DHAR, S. K.; ST CLAIR, D. K. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. **Free Radic Biol Med.** v. 52, n.11-12, p. 2209-22. 2012.

DI, D. *et al.* ABCA1 upregulating apolipoprotein M expression mediates via the RXR/LXR pathway in HepG2 cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 421, n.1, p. 152-6. 2012.

DIAZ-VALENCIA, P. A.; BOUGNERES, P.; VALLERON, A. J. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. **BMC Public Health.** v. 15, p. 255. 2015.

DIBLEY, M. J. *et al.* Interpretation of Z-score anthropometric indicators derived from the international growth reference. **The American journal of clinical nutrition.** v. 46, n.5, p. 749-762. 1987.

DILLMANN, C. *et al.* S1PR4 is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. **Biol Chem.** v. 396, n.6-7, p. 775-82. 2015.

DIMAS, G.; ILIADIS, F.; GREKAS, D. Matrix metalloproteinases, atherosclerosis, proteinuria and kidney disease: Linkage-based approaches. **Hippokratia**. v. 17, n.4, p. 292-7. 2013.

DING, B. S. *et al.* Aging Suppresses Sphingosine-1-Phosphate Chaperone ApoM in Circulation Resulting in Maladaptive Organ Repair. **Dev Cell**. v. 53, n.6, p. 677-690 e4. 2020.

DLOUHA, D. *et al.* Variants within HNF1alpha and ANGPTL4 genes and acute coronary syndrome in Czech population. The GENDEMIP study. **Neuro Endocrinol Lett**. v. 33 Suppl 2, p. 13-6. 2012.

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.

DORMAN, J. S. *et al.* The Pittsburgh insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) morbidity and mortality study. Mortality results. **Diabetes**. v. 33, n.3, p. 271-6. 1984.

DROUIN-CHARTIER, J. P. *et al.* The elevation of plasma concentrations of apoB-48-containing lipoproteins in familial hypercholesterolemia is independent of PCSK9 levels. **Lipids Health Dis**. v. 16, n.1, p. 119. 2017.

DU, W. *et al.* Low apolipoprotein M serum levels correlate with Systemic lupus erythematosus disease activity and apolipoprotein M gene polymorphisms with Lupus. **Lipids Health Dis**. v. 16, n.1, p. 88. 2017.

DUAN, J.; DAHLBACK, B.; VILLOUTREIX, B. O. Proposed lipocalin fold for apolipoprotein M based on bioinformatics and site-directed mutagenesis. **FEBS Lett**. v. 499, n.1-2, p. 127-32. 2001.

DUDEK, S. M. *et al.* Abl tyrosine kinase phosphorylates nonmuscle Myosin light chain kinase to regulate endothelial barrier function. **Mol Biol Cell**. v. 21, n.22, p. 4042-56. 2010.

DUKES, I. D. *et al.* Defective pancreatic beta-cell glycolytic signaling in hepatocyte nuclear factor-1alpha-deficient mice. **J Biol Chem**. v. 273, n.38, p. 24457-64. 1998.

DUTKIEWICZ, G. *et al.* Polymorphisms of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase genes in patients with post-transplant diabetes mellitus. **Arch Med Res**. v. 41, n.5, p. 350-5. 2010.

EBARA, T. *et al.* Chylomicronemia due to apolipoprotein CIII overexpression in apolipoprotein E-null mice. Apolipoprotein CIII-induced hypertriglyceridemia is not mediated by effects on apolipoprotein E. **J Clin Invest**. v. 99, n.11, p. 2672-81. 1997.

EDDAIKRA, A. *et al.* Clinical variables and ethnicity may influenced by polymorphism of CAT -262C/T and MnSOD 47C/T antioxidant enzymes in Algerian type1 diabetes without complications. **Gene**. v. 670, p. 182-192. 2018.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**. v. 2, n.3, p. 161-74. 2002.

EISENBERG, S. High density lipoprotein metabolism. **J Lipid Res**. v. 25, n.10, p. 1017-58. 1984.

EIZIRIK, D. L.; COLLI, M. L. Revisiting the role of inflammation in the loss of pancreatic beta-cells in T1DM. **Nat Rev Endocrinol**. v. 16, n.11, p. 611-612. 2020.

EIZIRIK, D. L.; COLLI, M. L.; ORTIS, F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. **Nat Rev Endocrinol**. v. 5, n.4, p. 219-26. 2009.

EIZIRIK, D. L.; PASQUALI, L.; CNOP, M. Pancreatic beta-cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. **Nat Rev Endocrinol**. v. 16, n.7, p. 349-362. 2020.

EIZIRIK, D. L. *et al.* The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines. **PLoS Genet**. v. 8, n.3, p. e1002552. 2012.

EL-MASRY, T. M. *et al.* Manganese superoxide dismutase alanine to valine polymorphism and risk of neuropathy and nephropathy in Egyptian type 1 diabetic patients. **Rev Diabet Stud**. v. 2, n.2, p. 70-4. 2005.

ELDING LARSSON, H. A Swedish approach to the prevention of type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes**. v. 17 Suppl 22, p. 73-7. 2016.

ELLARD, S.; COLCLOUGH, K. Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A) and 4 alpha (HNF4A) in maturity-onset diabetes of the young. **Hum Mutat**. v. 27, n.9, p. 854-69. 2006.

EVANS, J. L. *et al.* Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? **Diabetes**. v. 52, n.1, p. 1-8. 2003.

FEINGOLD, K. R. *et al.* Infection and inflammation decrease apolipoprotein M expression. **Atherosclerosis**. v. 199, n.1, p. 19-26. 2008.

FENG, S. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins. **PLoS One**. v. 6, n.8, p. e20599. 2011.

FERNANDEZ-RAMOS, C. *et al.* Incidence of childhood-onset type 1 diabetes in Biscay, Spain, 1990-2013. **Pediatr Diabetes**. v. 18, n.1, p. 71-76. 2017.

FERRER, J. A genetic switch in pancreatic beta-cells: implications for differentiation and haploinsufficiency. **Diabetes**. v. 51, n.8, p. 2355-62. 2002.

FERRONI, P. *et al.* Serum metalloproteinase 9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation. **J Investig Med**. v. 51, n.5, p. 295-300. 2003.

FEUERBORN, R. *et al.* High density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine 1-phosphate (S1P) inhibits macrophage apoptosis by stimulating STAT3 activity and survivin expression. **Atherosclerosis**. v. 257, p. 29-37. 2017.

FICHNA, M. *et al.* Polymorphism in BACH2 gene is a marker of polyglandular autoimmunity. **Endocrine**. v. 74, n.1, p. 72-79. 2021.

FIGUEIREDO, E. A. *et al.* Rotator Cuff Tear Susceptibility Is Associated With Variants in Genes Involved in Tendon Extracellular Matrix Homeostasis. **J Orthop Res**. v. 38, n.1, p. 192-201. 2020.

FLEKAC, M. *et al.* Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. **BMC Med Genet**. v. 9, p. 30. 2008.

FLOYEL, T.; KAUR, S.; POCIOT, F. Genes affecting beta-cell function in type 1 diabetes. **Curr Diab Rep**. v. 15, n.11, p. 97. 2015.

FOGELSTRAND, P.; BOREN, J. Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**. v. 22, n.1, p. 1-7. 2012.

FRANCIS, M. C.; FROHLICH, J. J. Coronary artery disease in patients at low risk--apolipoprotein AI as an independent risk factor. **Atherosclerosis**. v. 155, n.1, p. 165-70. 2001.

FRITSCH, M. *et al.* Diabetic ketoacidosis at diagnosis in Austrian children: a population-based analysis, 1989-2011. **J Pediatr**. v. 163, n.5, p. 1484-8 e1. 2013.

FROGUEL, P.; VELHO, G. Molecular Genetics of Maturity-onset Diabetes of the Young. **Trends Endocrinol Metab**. v. 10, n.4, p. 142-146. 1999.

FU, J. *et al.* Using Clinical Indices to Distinguish MODY2 (GCK Mutation) and MODY3 (HNF1A Mutation) from Type 1 Diabetes in a Young Chinese Population. **Diabetes Ther**. v. 10, n.4, p. 1381-1390. 2019.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxid Redox Signal**. v. 15, n.6, p. 1583-606. 2011.

FUKUHARA, S. *et al.* The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. **J Clin Invest**. v. 122, n.4, p. 1416-26. 2012.

GALIS, Z. S.; KHATRI, J. J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. **Circ Res**. v. 90, n.3, p. 251-62. 2002.

GANGABADAGE, C. S. *et al.* Structure and dynamics of human apolipoprotein CIII. **J Biol Chem**. v. 283, n.25, p. 17416-27. 2008.

GANJALI, S. *et al.* HDL functionality in type 1 diabetes. **Atherosclerosis**. v. 267, p. 99-109. 2017.

GARCIA-FERNANDEZ, N. *et al.* Matrix Metalloproteinases in Diabetic Kidney Disease. **J Clin Med**. v. 9, n.2, p. 2020.

GARRIS, C. S. *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptor 1 signalling in T cells: trafficking and beyond. **Immunology**. v. 142, n.3, p. 347-53. 2014.

GARRIS, C. S. *et al.* Defective sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) phosphorylation exacerbates TH17-mediated autoimmune neuroinflammation. **Nat Immunol**. v. 14, n.11, p. 1166-72. 2013.

GAUDET, D. *et al.* Antisense Inhibition of Apolipoprotein C-III in Patients with Hypertriglyceridemia. **N Engl J Med**. v. 373, n.5, p. 438-47. 2015.

GAULTON, K. J. *et al.* Genetic fine mapping and genomic annotation defines causal mechanisms at type 2 diabetes susceptibility loci. **Nat Genet**. v. 47, n.12, p. 1415-25. 2015.

GHARAGOZLIAN, S. *et al.* Matrix metalloproteinases in subjects with type 1 diabetes. **BMC Clin Pathol**. v. 9, p. 7. 2009.

GINSBERG, H. N. *et al.* Association of postprandial triglyceride and retinyl palmitate responses with newly diagnosed exercise-induced myocardial ischemia in middle-aged men and women. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 15, n.11, p. 1829-38. 1995.

GINSBERG, H. N. *et al.* Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins CIII and AI. Evidence that apolipoprotein CIII inhibits catabolism of triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase in vivo. **J Clin Invest**. v. 78, n.5, p. 1287-95. 1986.

GIUFFRIDA, F. M.; REIS, A. F. Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young. **Diabetes Obes Metab**. v. 7, n.4, p. 318-26. 2005.

GOH, V. J. *et al.* Novel Index of Maladaptive Myocardial Remodeling in Hypertension. **Circ Cardiovasc Imaging**. v. 10, n.9, p. 2017.

GOMES, M. B. *et al.* Diabetes-related chronic complications in Brazilian adolescents with type 1 diabetes. A multicenter cross-sectional study. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 177, p. 108895. 2021.

GOMES, M. B.; NEGRATO, C. A. Adherence to insulin therapeutic regimens in patients with type 1 diabetes. A nationwide survey in Brazil. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 120, p. 47-55. 2016.

GORNIK, O.; LAUC, G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. **Dis Markers**. v. 25, n.4-5, p. 267-78. 2008.

GOTTO, A. M., JR.; POWNALL, H. J.; HAVEL, R. J. Introduction to the plasma lipoproteins. **Methods Enzymol**. v. 128, p. 3-41. 1986.

GOTTO, A. M., JR. *et al.* Relation between baseline and on-treatment lipid parameters and first acute major coronary events in the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS). **Circulation**. v. 101, n.5, p. 477-84. 2000.

GOTTUMUKKALA, R. V. *et al.* Myocardial infarction triggers chronic cardiac autoimmunity in type 1 diabetes. **Sci Transl Med**. v. 4, n.138, p. 138ra80. 2012.

GOURGARI, E. *et al.* Low cholesterol efflux capacity and abnormal lipoprotein particles in youth with type 1 diabetes: a case control study. **Cardiovasc Diabetol**. v. 17, n.1, p. 158. 2018.

GRANT, S. F. *et al.* Follow-up analysis of genome-wide association data identifies novel loci for type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 58, n.1, p. 290-5. 2009.

GREGORY, E. M.; YOST, F. J., JR.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases of *Escherichia coli*: intracellular localization and functions. **J Bacteriol**. v. 115, n.3, p. 987-91. 1973.

GRIMBLE, R. F. Genotypic influences on metabolic alterations during inflammation and the nutritional outcome. **Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme**. v. 7, p. 1-13; discussion 13-8. 2002.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**. v. 140, n.6, p. 883-99. 2010.

GROSS, J. L. *et al.* Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 46, n.1, p. 16-26. 2002.

GROSSE, J. *et al.* Correction: Incidence of Diabetic Ketoacidosis of New-Onset Type 1 Diabetes in Children and Adolescents in Different Countries Correlates with Human Development Index (HDI): An Updated Systematic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression. **Horm Metab Res**. v. 50, n.3, p. e2. 2018.

GUO, S. *et al.* Higher level of plasma bioactive molecule sphingosine 1-phosphate in women is associated with estrogen. **Biochim Biophys Acta**. v. 1841, n.6, p. 836-46. 2014.

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.

HAJNY, S. *et al.* Increased plasma apoM levels impair triglyceride turnover in mice. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids**. v. 1866, n.9, p. 158969. 2021.

HAJNY, S. *et al.* Apolipoprotein M and Risk of Type 2 Diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 105, n.9, p. 2020.

HALADE, G. V.; JIN, Y. F.; LINDSEY, M. L. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. **Pharmacol Ther**. v. 139, n.1, p. 32-40. 2013.

HALIYUR, R. *et al.* Human islets expressing HNF1A variant have defective beta cell transcriptional regulatory networks. **J Clin Invest.** v. 129, n.1, p. 246-251. 2019.

HAN, X. J.; JIA, J. P. [Distribution characters and linkage disequilibrium analysis of APOM gene polymorphisms in Han population of North China]. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.** v. 24, n.3, p. 350-3. 2007.

HANAS, R.; LINDGREN, F.; LINDBLAD, B. Diabetic ketoacidosis and cerebral oedema in Sweden--a 2-year paediatric population study. **Diabet Med.** v. 24, n.10, p. 1080-5. 2007.

HANEL, P.; ANDREANI, P.; GRALER, M. H. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. **FASEB J.** v. 21, n.4, p. 1202-9. 2007.

HANSEN, S. K. *et al.* Genetic evidence that HNF-1alpha-dependent transcriptional control of HNF-4alpha is essential for human pancreatic beta cell function. **J Clin Invest.** v. 110, n.6, p. 827-33. 2002.

HAPMAP. **Reference SNP (rs) Report.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2542052?vertical_tab=true#frequency_tab>. Acesso em: 07/29/21.

HAPMAP. **Reference SNP (rs) Report.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3757247?vertical_tab=true#frequency_tab>. Acesso em: 08/02.

HAPMAP. **Reference SNP (rs) Report - rs17576.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs17576?vertical_tab=true#frequency_tab>. Acesso em: 11/17.

HAPMAP. **Reference SNP (rs) Report - rs797021.** Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs797021>>. Acesso em: 11/15.

HAPMAP. **Reference SNP (rs) Report - rs805264.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs805264?vertical_tab=true#frequency_tab>. Acesso em: 08/02.

HAPMAP. **Reference SNP (rs) Report - rs7310409.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs7310409?vertical_tab=true#frequency_tab>. Acesso em: 11/17.

HARRIES, L. W. Alternate mRNA processing of the hepatocyte nuclear factor genes and its role in monogenic diabetes. **Expert Rev Endocrinol Metab.** v. 1, n.6, p. 715-726. 2006.

HEGELE, R. A. *et al.* The hepatic nuclear factor-1alpha G319S variant is associated with early-onset type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 84, n.3, p. 1077-82. 1999.

HEGELE, R. A. *et al.* Disparity between association and linkage analysis for HNF1A G319S in type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree. **J Hum Genet.** v. 45, n.3, p. 184-7. 2000.

HEIER, M. *et al.* Reduced HDL function in children and young adults with type 1 diabetes. **Cardiovasc Diabetol.** v. 16, n.1, p. 85. 2017.

HEINECKE, J. W. The HDL proteome: a marker--and perhaps mediator--of coronary artery disease. **J Lipid Res.** v. 50 Suppl, p. S167-71. 2009.

HELLERSTEIN, M.; TURNER, S. Reverse cholesterol transport fluxes. **Curr Opin Lipidol.** v. 25, n.1, p. 40-7. 2014.

HENDRIKS, R. W.; MIDDENDORP, S. The pre-BCR checkpoint as a cell-autonomous proliferation switch. **Trends Immunol.** v. 25, n.5, p. 249-56. 2004.

HENRIQUES, R. S. *et al.* Direct Costs of Type 2 Diabetes: A Brazilian Cost-of-Illness Study. **Int J Technol Assess Health Care.** v. 34, n.2, p. 180-188. 2018.

HISANO, Y. *et al.* Mouse SPNS2 functions as a sphingosine-1-phosphate transporter in vascular endothelial cells. **PLoS One.** v. 7, n.6, p. e38941. 2012.

HIUKKA, A. *et al.* ApoCIII-enriched LDL in type 2 diabetes displays altered lipid composition, increased susceptibility for sphingomyelinase, and increased binding to biglycan. **Diabetes.** v. 58, n.9, p. 2018-26. 2009.

HLA, T.; MACIAG, T. An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. **J Biol Chem.** v. 265, n.16, p. 9308-13. 1990.

HOKANSON, J. E. *et al.* Susceptibility to type 1 diabetes is associated with ApoCIII gene haplotypes. **Diabetes.** v. 55, n.3, p. 834-8. 2006.

HOLMBERG, R. *et al.* Lowering apolipoprotein CIII delays onset of type 1 diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 108, n.26, p. 10685-9. 2011.

HOLMKVIST, J. *et al.* Common variants in HNF-1 alpha and risk of type 2 diabetes. **Diabetologia.** v. 49, n.12, p. 2882-91. 2006.

HOMMA, T. K. *et al.* Dyslipidemia in young patients with type 1 diabetes mellitus. **Arch Endocrinol Metab.** v. 59, n.3, p. 215-9. 2015.

HOPPS, E.; CAIMI, G. Matrix metalloproteases as a pharmacological target in cardiovascular diseases. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** v. 19, n.14, p. 2583-9. 2015.

HOSHINO, H. *et al.* Oxidative stress abolishes leptomycin B-sensitive nuclear export of transcription repressor Bach2 that counteracts activation of Maf recognition element. **J Biol Chem.** v. 275, n.20, p. 15370-6. 2000.

HOSSEINI-ESFAHANI, F. *et al.* Dietary patterns interact with APOA1/APOC3 polymorphisms to alter the risk of the metabolic syndrome: the Tehran Lipid and Glucose Study. **Br J Nutr.** v. 113, n.4, p. 644-53. 2015.

HOSSEINI-ESFAHANI, F. *et al.* The Effect of Interactions of Single Nucleotide Polymorphisms of APOA1/APOC3 with Food Group Intakes on the Risk of Metabolic Syndrome. **Avicenna J Med Biotechnol.** v. 9, n.2, p. 94-103. 2017.

HOSTENS, K. *et al.* Exposure of human islets to cytokines can result in disproportionately elevated proinsulin release. **J Clin Invest.** v. 104, n.1, p. 67-72. 1999.

HOVNIK, T. *et al.* Genetic polymorphisms in genes encoding antioxidant enzymes are associated with diabetic retinopathy in type 1 diabetes. **Diabetes Care.** v. 32, n.12, p. 2258-62. 2009.

HSU, L. A. *et al.* Effect of obesity on the association between common variations in the HNF1A gene region and C-reactive protein level in Taiwanese. **Clin Chim Acta.** v. 412, n.9-10, p. 725-9. 2011.

HU, H. J. *et al.* Common variants at the promoter region of the APOM confer a risk of rheumatoid arthritis. **Exp Mol Med.** v. 43, n.11, p. 613-21. 2011.

HU, J. X.; THOMAS, C. E.; BRUNAK, S. Network biology concepts in complex disease comorbidities. **Nat Rev Genet.** v. 17, n.10, p. 615-29. 2016.

HUANG, M. C. *et al.* Th17 augmentation in OTII TCR plus T cell-selective type 1 sphingosine 1-phosphate receptor double transgenic mice. **J Immunol.** v. 178, n.11, p. 6806-13. 2007.

HUANG, Y. *et al.* Apolipoprotein m (APOM) levels and APOM rs805297 G/T polymorphism are associated with increased risk of rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine.** v. 81, n.1, p. 32-6. 2014.

HUANG, Y. C. *et al.* Genome-wide association study of diabetic retinopathy in a Taiwanese population. **Ophthalmology.** v. 118, n.4, p. 642-8. 2011.

HUHTALA, P. *et al.* Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. **J Biol Chem.** v. 266, n.25, p. 16485-90. 1991.

IGARASHI, K.; KUROSAKI, T.; ROYCHOUDHURI, R. BACH transcription factors in innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol.** v. 17, n.7, p. 437-450. 2017.

IGARASHI, K.; WATANABE-MATSUI, M. Wearing red for signaling: the heme-bach axis in heme metabolism, oxidative stress response and iron immunology. **Tohoku J Exp Med.** v. 232, n.4, p. 229-53. 2014.

Implications of the Diabetes Control and Complications Trial. American Diabetes Association. **Diabetes Care**. v. 16, n.11, p. 1517-20. 1993.

INSEL, R.; DUNNE, J. L. JDRF's vision and strategy for prevention of type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes**. v. 17 Suppl 22, p. 87-92. 2016.

INSEL, R. A. *et al.* Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. **Diabetes Care**. v. 38, n.10, p. 1964-74. 2015.

ISOMAA, B. *et al.* Chronic diabetic complications in patients with MODY3 diabetes. **Diabetologia**. v. 41, n.4, p. 467-73. 1998.

ITO, S. *et al.* Increased plasma sphingosine-1-phosphate in obese individuals and its capacity to increase the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in adipocytes. **Coron Artery Dis**. v. 24, n.8, p. 642-50. 2013.

ITO, Y. *et al.* Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. **Science**. v. 249, n.4970, p. 790-3. 1990.

JACQUEMIN, P.; LEMAIGRE, F. P.; ROUSSEAU, G. G. The Onecut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of Pdx-1 in the specification cascade. **Dev Biol**. v. 258, n.1, p. 105-16. 2003.

JAPTOK, L. *et al.* Sphingosine 1-phosphate modulates antigen capture by murine Langerhans cells via the S1P2 receptor subtype. **PLoS One**. v. 7, n.11, p. e49427. 2012.

JAPTOK, L. *et al.* Sphingosine 1-phosphate counteracts insulin signaling in pancreatic beta-cells via the sphingosine 1-phosphate receptor subtype 2. **FASEB J**. v. 29, n.8, p. 3357-69. 2015.

JAYASHREE, K. *et al.* Circulating matrix modulators (MMP-9 and TIMP-1) and their association with severity of diabetic retinopathy. **Diabetes Metab Syndr**. v. 12, n.6, p. 869-873. 2018.

JENNE, C. N. *et al.* T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. **J Exp Med**. v. 206, n.11, p. 2469-81. 2009.

JENSEN, M. K. *et al.* High-Density Lipoprotein Subspecies Defined by Presence of Apolipoprotein C-III and Incident Coronary Heart Disease in Four Cohorts. **Circulation**. v. 137, n.13, p. 1364-1373. 2018.

JENSEN, M. K. *et al.* Apolipoprotein C-III as a Potential Modulator of the Association Between HDL-Cholesterol and Incident Coronary Heart Disease. **J Am Heart Assoc**. v. 1, n.2, p. 2012.

JERRAM, S. T.; LESLIE, R. D. The Genetic Architecture of Type 1 Diabetes. **Genes (Basel)**. v. 8, n.8, p. 2017.

JIANG, H. *et al.* TIMP-1 transgenic mice recover from diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin. **Diabetes**. v. 56, n.1, p. 49-56. 2007.

JIAO, G. Q. *et al.* A prospective evaluation of apolipoprotein M gene T-778C polymorphism in relation to coronary artery disease in Han Chinese. **Clin Biochem**. v. 40, n.15, p. 1108-12. 2007.

JONES, D. A. *et al.* Association between the rs4880 superoxide dismutase 2 (C>T) gene variant and coronary heart disease in diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 90, n.2, p. 196-201. 2010.

JONES, P. L.; PING, D.; BOSS, J. M. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP-beta and NF-kappaB. **Mol Cell Biol**. v. 17, n.12, p. 6970-81. 1997.

JONG, M. C.; HOFKER, M. H.; HAVEKES, L. M. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 19, n.3, p. 472-84. 1999.

JORGENSEN, M. E.; ALMDAL, T. P.; CARSTENSEN, B. Time trends in mortality rates in type 1 diabetes from 2002 to 2011. **Diabetologia**. v. 56, n.11, p. 2401-4. 2013.

JUNTTI-BERGGREN, L. *et al.* Apolipoprotein CIII promotes Ca²⁺-dependent beta cell death in type 1 diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 101, n.27, p. 10090-4. 2004.

JUSZCZAK, A. *et al.* Plasma Fucosylated Glycans and C-Reactive Protein as Biomarkers of HNF1A-MODY in Young Adult-Onset Nonautoimmune Diabetes. **Diabetes Care**. v. 42, n.1, p. 17-26. 2019.

KANNAN, P. *et al.* N-ras oncogene causes AP-2 transcriptional self-interference, which leads to transformation. **Genes Dev**. v. 8, n.11, p. 1258-69. 1994.

KANTER, J. E. *et al.* Increased apolipoprotein C3 drives cardiovascular risk in type 1 diabetes. **J Clin Invest**. v. 129, n.10, p. 4165-4179. 2019.

KAPOOR, C. *et al.* Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). **J Cancer Res Ther**. v. 12, n.1, p. 28-35. 2016.

KARUNA, R. *et al.* Plasma levels of sphingosine-1-phosphate and apolipoprotein M in patients with monogenic disorders of HDL metabolism. **Atherosclerosis**. v. 219, n.2, p. 855-63. 2011.

KATHIRESAN, S. *et al.* Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. **Nat Genet**. v. 41, n.1, p. 56-65. 2009.

KATSAROU, A. *et al.* Type 1 diabetes mellitus. **Nat Rev Dis Primers**. v. 3, p. 17016. 2017.

KAWAKAMI, A. *et al.* Apolipoprotein CIII induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells and increases adhesion of monocytic cells. **Circulation**. v. 114, n.7, p. 681-7. 2006.

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.

KHOKHA, R.; MURTHY, A.; WEISS, A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**. v. 13, n.9, p. 649-65. 2013.

KIANI, A. K. *et al.* Genetic link of type 1 diabetes susceptibility loci with rheumatoid arthritis in Pakistani patients. **Immunogenetics**. v. 67, n.5-6, p. 277-82. 2015.

KIM, E. H. *et al.* Bach2 regulates homeostasis of Foxp3+ regulatory T cells and protects against fatal lung disease in mice. **J Immunol**. v. 192, n.3, p. 985-95. 2014.

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, Y. H.; KWON, H. J.; KIM, D. S. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)-dependent processing of betaig-h3 protein regulates cell migration, invasion, and adhesion. **J Biol Chem**. v. 287, n.46, p. 38957-69. 2012.

KIMURA, T. *et al.* Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. **J Biol Chem**. v. 276, n.34, p. 31780-5. 2001.

KIMURA, T. *et al.* High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 23, n.7, p. 1283-8. 2003.

KIMURA, T. *et al.* Sphingosine 1-phosphate receptors mediate stimulatory and inhibitory signalings for expression of adhesion molecules in endothelial cells. **Cell Signal**. v. 18, n.6, p. 841-50. 2006.

KLITZ, W. *et al.* Association of CTLA-4 variation with type I diabetes in Filipinos. **Immunogenetics**. v. 54, n.5, p. 310-3. 2002.

KOBAYASHI, N. *et al.* Characterization of the ATP-dependent sphingosine 1-phosphate transporter in rat erythrocytes. **J Biol Chem**. v. 284, n.32, p. 21192-200. 2009.

KOBAYASHI, N. *et al.* Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner. **J Lipid Res**. v. 47, n.3, p. 614-21. 2006.

KOBAYASHI, T. *et al.* Glycation of HDL Polymerizes Apolipoprotein M and Attenuates Its Capacity to Bind to Sphingosine 1-Phosphate. **J Atheroscler Thromb**. v. 28, n.7, p. 730-741. 2021.

KOEPSSELL, H.; LIPS, K.; VOLK, C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. **Pharm Res.** v. 24, n.7, p. 1227-51. 2007.

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.

KOUKOS, G. *et al.* Naturally occurring and bioengineered apoA-I mutations that inhibit the conversion of discoidal to spherical HDL: the abnormal HDL phenotypes can be corrected by treatment with LCAT. **Biochem J.** v. 406, n.1, p. 167-74. 2007.

KOWALSKI, G. M. *et al.* Plasma sphingosine-1-phosphate is elevated in obesity. **PLoS One.** v. 8, n.9, p. e72449. 2013.

KRIMBOU, L.; MARCIL, M.; GENEST, J. New insights into the biogenesis of human high-density lipoproteins. **Curr Opin Lipidol.** v. 17, n.3, p. 258-67. 2006.

KRITIS, A. A. *et al.* An indirect negative autoregulatory mechanism involved in hepatocyte nuclear factor-1 gene expression. **Nucleic Acids Res.** v. 21, n.25, p. 5882-9. 1993.

KROLEWSKI, A. S. *et al.* Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin-dependent diabetes mellitus. **Am J Cardiol.** v. 59, n.8, p. 750-5. 1987.

KRUGER-GENGE, A. *et al.* Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. **Int J Mol Sci.** v. 20, n.18, p. 2019.

KUNITAKE, S. T.; LA SALA, K. J.; KANE, J. P. Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins with pre-beta electrophoretic mobility. **J Lipid Res.** v. 26, n.5, p. 549-55. 1985.

KUO, C. J. *et al.* A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. **Nature.** v. 355, n.6359, p. 457-61. 1992.

KURANO, M. *et al.* LDL receptor and ApoE are involved in the clearance of ApoM-associated sphingosine 1-phosphate. **J Biol Chem.** v. 290, n.4, p. 2477-88. 2015.

KURANO, M. *et al.* Protection Against Insulin Resistance by Apolipoprotein M/Sphingosine-1-Phosphate. **Diabetes.** v. 69, n.5, p. 867-881. 2020.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutr J.** v. 15, n.1, p. 71. 2016.

KUVIN, J. T.; ALSHEIKH-ALI, A. A.; KARAS, R. H. High-density lipoprotein cholesterol-raising strategies. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 47, n.2, p. 196-204. 2006.

KUWAHARA, M. *et al.* Bach2-Batf interactions control Th2-type immune response by regulating the IL-4 amplification loop. **Nat Commun.** v. 7, p. 12596. 2016.

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

LAING, S. P. *et al.* Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. **Diabetologia.** v. 46, n.6, p. 760-5. 2003.

LAKBAKBI EL YAAGOUBI, F. *et al.* Association analysis of genetic variants with metabolic syndrome components in the Moroccan population. **Curr Res Transl Med.** v. 65, n.3, p. 121-125. 2017.

LARSSON, M. *et al.* Apolipoproteins C-I and C-III inhibit lipoprotein lipase activity by displacement of the enzyme from lipid droplets. **J Biol Chem.** v. 288, n.47, p. 33997-34008. 2013.

LAU, H. H. *et al.* The molecular functions of hepatocyte nuclear factors - In and beyond the liver. **J Hepatol.** v. 68, n.5, p. 1033-1048. 2018.

LAVINI-RAMOS, C. *et al.* MMP9 integrates multiple immunoregulatory pathways that discriminate high suppressive activity of human mesenchymal stem cells. **Sci Rep.** v. 7, n.1, p. 874. 2017.

LEBENTHAL, Y. *et al.* The unique clinical spectrum of maturity onset diabetes of the young type 3. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 135, p. 18-22. 2018.

LEE, S. J. *et al.* LDL containing apolipoprotein CIII is an independent risk factor for coronary events in diabetic patients. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 23, n.5, p. 853-8. 2003.

LELONGT, B. *et al.* Matrix metalloproteinase 9 protects mice from anti-glomerular basement membrane nephritis through its fibrinolytic activity. **J Exp Med.** v. 193, n.7, p. 793-802. 2001.

LEMKES, B. A. *et al.* Hyperglycemia: a prothrombotic factor? **J Thromb Haemost.** v. 8, n.8, p. 1663-9. 2010.

LEY, S. H. *et al.* Association of apolipoprotein B with incident type 2 diabetes in an aboriginal Canadian population. **Clin Chem.** v. 56, n.4, p. 666-70. 2010.

LI, S. *et al.* Childhood cardiovascular risk factors and carotid vascular changes in adulthood: the Bogalusa Heart Study. **JAMA.** v. 290, n.17, p. 2271-6. 2003.

LI, W. W. *et al.* Common genetic variation in the promoter of the human apo CIII gene abolishes regulation by insulin and may contribute to hypertriglyceridemia. **J Clin Invest.** v. 96, n.6, p. 2601-5. 1995.

LIAO, J. J.; HUANG, M. C.; GOETZL, E. J. Cutting edge: Alternative signaling of Th17 cell development by sphingosine 1-phosphate. **J Immunol.** v. 178, n.9, p. 5425-8. 2007.

LISBOA, H. R. *et al.* Incidence of type 1 diabetes mellitus in Passo Fundo, RS, Brazil. **Braz J Med Biol Res.** v. 31, n.12, p. 1553-6. 1998.

LIU, G. *et al.* The receptor S1P1 overrides regulatory T cell-mediated immune suppression through Akt-mTOR. **Nat Immunol.** v. 10, n.7, p. 769-77. 2009.

LIU, G. *et al.* The S1P(1)-mTOR axis directs the reciprocal differentiation of T(H)1 and T(reg) cells. **Nat Immunol.** v. 11, n.11, p. 1047-56. 2010.

LIU, M. *et al.* Uncleaved ApoM signal peptide is required for formation of large ApoM/sphingosine 1-phosphate (S1P)-enriched HDL particles. **J Biol Chem.** v. 290, n.12, p. 7861-70. 2015.

LIU, R. *et al.* A Polymorphism in Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha, rs7310409, Is Associated with Left Main Coronary Artery Disease. **Biochem Res Int.** v. 2014, p. 924105. 2014.

LIVINGSTONE, S. J. *et al.* Estimated life expectancy in a Scottish cohort with type 1 diabetes, 2008-2010. **JAMA.** v. 313, n.1, p. 37-44. 2015.

LLAURADO, G. *et al.* Specific Nuclear Magnetic Resonance Lipoprotein Subclass Profiles and Central Arterial Stiffness in Type 1 Diabetes Mellitus: A Case Control Study. **J Clin Med.** v. 8, n.11, p. 2019.

LONGO, G. M. *et al.* Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. **J Clin Invest.** v. 110, n.5, p. 625-32. 2002.

LOPES, J. *et al.* Type VIII collagen mediates vessel wall remodeling after arterial injury and fibrous cap formation in atherosclerosis. **Am J Pathol.** v. 182, n.6, p. 2241-53. 2013.

LORENZL, S. *et al.* Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and their endogenous counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of Parkinson's disease. **Exp Neurol.** v. 178, n.1, p. 13-20. 2002.

LU, T. T. *et al.* Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. **Mol Cell.** v. 6, n.3, p. 507-15. 2000.

LUC, G. *et al.* Value of HDL cholesterol, apolipoprotein A-I, lipoprotein A-I, and lipoprotein A-I/A-II in prediction of coronary heart disease: the PRIME Study. Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 22, n.7, p. 1155-61. 2002.

LUC, G. *et al.* Apolipoproteins C-III and E in apoB- and non-apoB-containing lipoproteins in two populations at contrasting risk for myocardial infarction: the ECTIM

study. Etude Cas Temoins sur 'Infarctus du Myocarde. **J Lipid Res.** v. 37, n.3, p. 508-17. 1996.

LUHN, K. *et al.* Discontinuation of fucose therapy in LADII causes rapid loss of selectin ligands and rise of leukocyte counts. **Blood.** v. 97, n.1, p. 330-2. 2001.

LUND-KATZ, S. *et al.* High density lipoprotein structure. **Front Biosci.** v. 8, p. d1044-54. 2003.

LUNI, C.; MARTH, J. D.; DOYLE, F. J., 3RD. Computational modeling of glucose transport in pancreatic beta-cells identifies metabolic thresholds and therapeutic targets in diabetes. **PLoS One.** v. 7, n.12, p. e53130. 2012.

LUO, G. *et al.* Rosiglitazone enhances apolipoprotein M (ApoM) expression in rat's liver. **Int J Med Sci.** v. 11, n.10, p. 1015-21. 2014.

LUO, G. *et al.* Leptin inhibits apolipoprotein M transcription and secretion in human hepatoma cell line, HepG2 cells. **Biochim Biophys Acta.** v. 1734, n.2, p. 198-202. 2005.

LUO, G. *et al.* Palmitic acid suppresses apolipoprotein M gene expression via the pathway of PPARbeta/delta in HepG2 cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 445, n.1, p. 203-7. 2014.

LUO, Y.; LIANG, C. P.; TALL, A. R. The orphan nuclear receptor LXR-1 potentiates the sterol-mediated induction of the human CETP gene by liver X receptor. **J Biol Chem.** v. 276, n.27, p. 24767-73. 2001.

LUO, Z. *et al.* Hepatocyte nuclear factor 1A (HNF1A) as a possible tumor suppressor in pancreatic cancer. **PLoS One.** v. 10, n.3, p. e0121082. 2015.

LUSSIER, C. R. *et al.* Loss of hepatocyte-nuclear-factor-1alpha impacts on adult mouse intestinal epithelial cell growth and cell lineages differentiation. **PLoS One.** v. 5, n.8, p. e12378. 2010.

LYTVYN, Y.; PERKINS, B. A.; CHERNEY, D. Z. Uric acid as a biomarker and a therapeutic target in diabetes. **Can J Diabetes.** v. 39, n.3, p. 239-46. 2015.

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, X. *et al.* Anti-inflammatory effects of propofol are mediated by apolipoprotein M in a hepatocyte nuclear factor-1alpha-dependent manner. **Arch Biochem Biophys.** v. 533, n.1-2, p. 1-10. 2013.

MA, X. *et al.* Propofol Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Monocyte Chemoattractant Protein-1 Production Through Enhancing apoM and foxa2 Expression in HepG2 Cells. **Inflammation.** v. 38, n.3, p. 1329-36. 2015.

MAAHS, D. M. *et al.* Glucose control predicts 2-year change in lipid profile in youth with type 1 diabetes. **J Pediatr**. v. 162, n.1, p. 101-7 e1. 2013.

MAAHS, D. M. *et al.* Association of insulin sensitivity to lipids across the lifespan in people with Type 1 diabetes. **Diabet Med**. v. 28, n.2, p. 148-55. 2011.

MACARTHUR, J. *et al.* The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). **Nucleic Acids Res**. v. 45, n.D1, p. D896-D901. 2017.

MACEYKA, M. *et al.* Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. **Trends Cell Biol**. v. 22, n.1, p. 50-60. 2012.

MACEYKA, M.; SPIEGEL, S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. **Nature**. v. 510, n.7503, p. 58-67. 2014.

MAEDA, N. *et al.* Targeted disruption of the apolipoprotein C-III gene in mice results in hypotriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia. **J Biol Chem**. v. 269, n.38, p. 23610-6. 1994.

MAEHARA, K.; OH-HASHI, K.; ISOBE, K. I. Early growth-responsive-1-dependent manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by platelet-derived growth factor. **FASEB J**. v. 15, n.11, p. 2025-6. 2001.

MAHLEY, R. W. *et al.* Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. **J Lipid Res**. v. 25, n.12, p. 1277-94. 1984.

MALALLA, Z. H. *et al.* Sequence analysis and variant identification at the APOC3 gene locus indicates association of rs5218 with BMI in a sample of Kuwaiti's. **Lipids Health Dis**. v. 18, n.1, p. 224. 2019.

MALERBI, F. E. *et al.* Assessment of psychosocial variables by parents of youth with type 1 diabetes mellitus. **Diabetol Metab Syndr**. v. 4, n.1, p. 48. 2012.

MANICONE, A. M.; MCGUIRE, J. K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. **Semin Cell Dev Biol**. v. 19, n.1, p. 34-41. 2008.

MAR, R. *et al.* Association of the APOLIPOPROTEIN A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride levels and LDL particle size in familial combined hyperlipidemia. **Circ Res**. v. 94, n.7, p. 993-9. 2004.

MARATEB, H. R. *et al.* Prediction of dyslipidemia using gene mutations, family history of diseases and anthropometric indicators in children and adolescents: The CASPIAN-III study. **Comput Struct Biotechnol J**. v. 16, p. 121-130. 2018.

MARCOUX, C. *et al.* Lipoprotein distribution of apolipoprotein C-III and its relationship to the presence in plasma of triglyceride-rich remnant lipoproteins. **Metabolism**. v. 50, n.1, p. 112-9. 2001.

MARROQUI, L. *et al.* Interferon-alpha mediates human beta cell HLA class I overexpression, endoplasmic reticulum stress and apoptosis, three hallmarks of early human type 1 diabetes. **Diabetologia**. v. 60, n.4, p. 656-667. 2017.

MARROQUI, L. *et al.* BACH2, a candidate risk gene for type 1 diabetes, regulates apoptosis in pancreatic beta-cells via JNK1 modulation and crosstalk with the candidate gene PTPN2. **Diabetes**. v. 63, n.7, p. 2516-27. 2014.

MARTENSSON, I. L. *et al.* The pre-B cell receptor checkpoint. **FEBS Lett**. v. 584, n.12, p. 2572-9. 2010.

MATTILA, T. K.; DE BOER, A. Influence of intensive versus conventional glucose control on microvascular and macrovascular complications in type 1 and 2 diabetes mellitus. **Drugs**. v. 70, n.17, p. 2229-45. 2010.

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.

MAYO, P. *et al.* CNV analysis using TaqMan copy number assays. **Curr Protoc Hum Genet**. v. Chapter 2, p. Unit2 13. 2010.

MCALLISTER, K. *et al.* Identification of BACH2 and RAD51B as rheumatoid arthritis susceptibility loci in a meta-analysis of genome-wide data. **Arthritis Rheum**. v. 65, n.12, p. 3058-62. 2013.

MCCRIMMON, R. J.; RYAN, C. M.; FRIER, B. M. Diabetes and cognitive dysfunction. **Lancet**. v. 379, n.9833, p. 2291-9. 2012.

MCDONALD, T. J. *et al.* Islet autoantibodies can discriminate maturity-onset diabetes of the young (MODY) from Type 1 diabetes. **Diabet Med**. v. 28, n.9, p. 1028-33. 2011.

MCDONALD, T. J.; ELLARD, S. Maturity onset diabetes of the young: identification and diagnosis. **Ann Clin Biochem**. v. 50, n.Pt 5, p. 403-15. 2013.

MCLAUGHLIN, T. *et al.* Adipose Cell Size and Regional Fat Deposition as Predictors of Metabolic Response to Overfeeding in Insulin-Resistant and Insulin-Sensitive Humans. **Diabetes**. v. 65, n.5, p. 1245-54. 2016.

MEIJERMAN, I. *et al.* Pharmacogenetic screening of the gene deletion and duplications of CYP2D6. **Drug Metab Rev**. v. 39, n.1, p. 45-60. 2007.

MELCHERS, F. The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. **Nat Rev Immunol**. v. 5, n.7, p. 578-84. 2005.

MELENDEZ-RAMIREZ, L. Y.; RICHARDS, R. J.; CEFALU, W. T. Complications of type 1 diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am**. v. 39, n.3, p. 625-40. 2010.

MEMON, A. A. *et al.* The association between apolipoprotein M and insulin resistance varies with country of birth. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**. v. 24, n.11, p. 1174-80. 2014.

MENDIVIL, C. O. *et al.* Metabolism of very-low-density lipoprotein and low-density lipoprotein containing apolipoprotein C-III and not other small apolipoproteins. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 30, n.2, p. 239-45. 2010.

MENDOZA, A. *et al.* The transporter Spns2 is required for secretion of lymph but not plasma sphingosine-1-phosphate. **Cell Rep.** v. 2, n.5, p. 1104-10. 2012.

METCALFE, K. A. *et al.* Concordance for type 1 diabetes in identical twins is affected by insulin genotype. **Diabetes Care.** v. 24, n.5, p. 838-42. 2001.

MIAO, L.; ST CLAIR, D. K. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. **Free Radic Biol Med.** v. 47, n.4, p. 344-56. 2009.

MICHEAL, S. *et al.* Polymorphisms in matrix metalloproteinases MMP1 and MMP9 are associated with primary open-angle and angle closure glaucoma in a Pakistani population. **Mol Vis.** v. 19, p. 441-7. 2013.

MIRZA, A. H. *et al.* Effects of GWAS-associated genetic variants on lncRNAs within IBD and T1D candidate loci. **PLoS One.** v. 9, n.8, p. e105723. 2014.

MISHRA, A. *et al.* Association of matrix metalloproteinases (MMP2, MMP7 and MMP9) genetic variants with left ventricular dysfunction in coronary artery disease patients. **Clin Chim Acta.** v. 413, n.19-20, p. 1668-74. 2012.

MOBASSERI, M. *et al.* Prevalence and incidence of type 1 diabetes in the world: a systematic review and meta-analysis. **Health Promot Perspect.** v. 10, n.2, p. 98-115. 2020.

MOESTRUP, S. K.; NIELSEN, L. B. The role of the kidney in lipid metabolism. **Curr Opin Lipidol.** v. 16, n.3, p. 301-6. 2005.

MOHAMMEDI, K. *et al.* Manganese superoxide dismutase (SOD2) polymorphisms, plasma advanced oxidation protein products (AOPP) concentration and risk of kidney complications in subjects with type 1 diabetes. **PLoS One.** v. 9, n.5, p. e96916. 2014.

MOLLSTEN, A. *et al.* The V16A polymorphism in SOD2 is associated with increased risk of diabetic nephropathy and cardiovascular disease in type 1 diabetes. **Diabetologia.** v. 52, n.12, p. 2590-3. 2009.

MOLLSTEN, A. *et al.* A functional polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and diabetic nephropathy. **Diabetes.** v. 56, n.1, p. 265-9. 2007.

MONDAL, S. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. **Eur J Med Chem.** v. 194, p. 112260. 2020.

MORARIU-ZAMFIR, R. *et al.* Influence of CD34+ marrow cell dose on outcome of HLA-identical sibling allogeneic bone marrow transplants in patients with chronic myeloid leukaemia. **Bone Marrow Transplantation.** v. 27, n.6, p. 575-580. 2001.

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.

MORTON, R. E.; GREENE, D. J. Conversion of lipid transfer inhibitor protein (apolipoprotein F) to its active form depends on LDL composition. **J Lipid Res**. v. 52, n.12, p. 2262-2271. 2011.

MOSIALOU, I.; KRASAGAKIS, K.; KARDASSIS, D. Opposite regulation of the human apolipoprotein M gene by hepatocyte nuclear factor 1 and Jun transcription factors. **J Biol Chem**. v. 286, n.19, p. 17259-69. 2011.

MOSIALOU, I.; ZANNIS, V. I.; KARDASSIS, D. Regulation of human apolipoprotein m gene expression by orphan and ligand-dependent nuclear receptors. **J Biol Chem**. v. 285, n.40, p. 30719-30. 2010.

MOSS, S. E.; KLEIN, R.; KLEIN, B. E. Cause-specific mortality in a population-based study of diabetes. **Am J Public Health**. v. 81, n.9, p. 1158-62. 1991.

MUGHAL, S. A. *et al.* Apolipoprotein M can discriminate HNF1A-MODY from Type 1 diabetes. **Diabet Med**. v. 30, n.2, p. 246-50. 2013.

MUONA, P. *et al.* Hyperglycemic glucose concentrations up-regulate the expression of type VI collagen in vitro. Relevance to alterations of peripheral nerves in diabetes mellitus. **Am J Pathol**. v. 142, n.5, p. 1586-97. 1993.

MURATA, N. *et al.* Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. **Biochem J**. v. 352 Pt 3, p. 809-15. 2000.

MUTO, A. *et al.* The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. **Nature**. v. 429, n.6991, p. 566-71. 2004.

NADEAU, K. J. *et al.* Insulin resistance in adolescents with type 1 diabetes and its relationship to cardiovascular function. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 95, n.2, p. 513-21. 2010.

NAGAHASHI, M. *et al.* Spns2, a transporter of phosphorylated sphingoid bases, regulates their blood and lymph levels, and the lymphatic network. **FASEB J**. v. 27, n.3, p. 1001-11. 2013.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F., JR. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem**. v. 274, n.31, p. 21491-4. 1999.

NAJEM, S. *et al.* Glycemic control and complications of type 1 diabetes among children in Tanzania. **J Clin Transl Endocrinol**. v. 23, p. 100245. 2021.

NAJMI, L. A. *et al.* Functional Investigations of HNF1A Identify Rare Variants as Risk Factors for Type 2 Diabetes in the General Population. **Diabetes**. v. 66, n.2, p. 335-346. 2017.

NAMMO, T. *et al.* Expression of HNF-4alpha (MODY1), HNF-1beta (MODY5), and HNF-1alpha (MODY3) proteins in the developing mouse pancreas. **Gene Expr Patterns**. v. 8, n.2, p. 96-106. 2008.

NAQVI, A. A. T.; HASAN, G. M.; HASSAN, M. I. Investigating the role of transcription factors of pancreas development in pancreatic cancer. **Pancreatology**. v. 18, n.2, p. 184-190. 2018.

NATHAN, D. M. *et al.* Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **N Engl J Med**. v. 353, n.25, p. 2643-53. 2005.

NEGRATO, C. A. *et al.* Temporal trends in incidence of Type 1 diabetes between 1986 and 2006 in Brazil. **J Endocrinol Invest**. v. 33, n.6, p. 373-7. 2010.

NICOD, N.; PARKER, R. S. Vitamin E secretion by Caco-2 monolayers to APOA1, but not to HDL, is vitamer selective. **J Nutr**. v. 143, n.10, p. 1565-72. 2013.

NIELSEN, L. B. *et al.* ApoM: gene regulation and effects on HDL metabolism. **Trends Endocrinol Metab**. v. 20, n.2, p. 66-71. 2009.

NIESOR, E. J. Different effects of compounds decreasing cholesteryl ester transfer protein activity on lipoprotein metabolism. **Curr Opin Lipidol**. v. 22, n.4, p. 288-95. 2011.

NIMRI, R.; PHILLIP, M.; SHALITIN, S. Children diagnosed with diabetes during infancy have unique clinical characteristics. **Horm Res**. v. 67, n.6, p. 263-7. 2007.

NISHI, T. *et al.* Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters. **Biochim Biophys Acta**. v. 1841, n.5, p. 759-65. 2014.

NISSINEN, L.; KAHARI, V. M. Matrix metalloproteinases in inflammation. **Biochim Biophys Acta**. v. 1840, n.8, p. 2571-80. 2014.

NIU, N. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the proximal promoter region of apolipoprotein M gene (apoM) confer the susceptibility to development of type 2 diabetes in Han Chinese. **Diabetes Metab Res Rev**. v. 23, n.1, p. 21-5. 2007.

NOBLE, J. A. *et al.* The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. **Am J Hum Genet**. v. 59, n.5, p. 1134-48. 1996.

NOFER, J. R. *et al.* Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. **J Biol Chem**. v. 276, n.37, p. 34480-5. 2001.

NOJIRI, T. *et al.* Modulation of sphingosine-1-phosphate and apolipoprotein M levels in the plasma, liver and kidneys in streptozotocin-induced diabetic mice. **J Diabetes Investig**. v. 5, n.6, p. 639-48. 2014.

NOMIYAMA, T. *et al.* The polymorphism of manganese superoxide dismutase is associated with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. **J Hum Genet.** v. 48, n.3, p. 138-41. 2003.

NORATA, G. D. *et al.* Apolipoprotein C-III: From Pathophysiology to Pharmacology. **Trends Pharmacol Sci.** v. 36, n.10, p. 675-687. 2015.

NUTT, S. L. *et al.* The genetic network controlling plasma cell differentiation. **Semin Immunol.** v. 23, n.5, p. 341-9. 2011.

O'BRIEN, V. P. *et al.* Hepatocyte nuclear factor 1 regulates the expression of the organic cation transporter 1 via binding to an evolutionary conserved region in intron 1 of the OCT1 gene. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 347, n.1, p. 181-92. 2013.

ODOM, D. T. *et al.* Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. **Science.** v. 303, n.5662, p. 1378-81. 2004.

OGAWA, K. *et al.* Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. **EMBO J.** v. 20, n.11, p. 2835-43. 2001.

OHKAWA, R. *et al.* Plasma sphingosine-1-phosphate measurement in healthy subjects: close correlation with red blood cell parameters. **Ann Clin Biochem.** v. 45, n.Pt 4, p. 356-63. 2008.

OLIN-LEWIS, K. *et al.* ApoC-III content of apoB-containing lipoproteins is associated with binding to the vascular proteoglycan biglycan. **J Lipid Res.** v. 43, n.11, p. 1969-77. 2002.

OLING, V. *et al.* Autoantigen-specific memory CD4+ T cells are prevalent early in progression to Type 1 diabetes. **Cell Immunol.** v. 273, n.2, p. 133-9. 2012.

OLOFSSON, S. O.; BOREN, J. Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. **J Intern Med.** v. 258, n.5, p. 395-410. 2005.

OLOFSSON, S. O.; WIKLUND, O.; BOREN, J. Apolipoproteins A-I and B: biosynthesis, role in the development of atherosclerosis and targets for intervention against cardiovascular disease. **Vasc Health Risk Manag.** v. 3, n.4, p. 491-502. 2007.

ONUMA, H. *et al.* Variants in the BACH2 and CLEC16A gene might be associated with susceptibility to insulin-triggered type 1 diabetes. **J Diabetes Investig.** v. 10, n.6, p. 1447-1453. 2019a.

ONUMA, H. *et al.* Variants in the BACH2 and CLEC16A gene might be associated with susceptibility to insulin-triggered type 1 diabetes. **J Diabetes Investig.** v. p. 2019b.

OOI, E. M. *et al.* Apolipoprotein C-III: understanding an emerging cardiovascular risk factor. **Clin Sci (Lond).** v. 114, n.10, p. 611-24. 2008.

OP DE BEECK, A.; EIZIRIK, D. L. Viral infections in type 1 diabetes mellitus--why the beta cells? **Nat Rev Endocrinol**. v. 12, n.5, p. 263-273. 2016.

OPDENAKKER, G.; ABU EL-ASRAR, A. Metalloproteinases mediate diabetes-induced retinal neuropathy and vasculopathy. **Cell Mol Life Sci**. v. 76, n.16, p. 3157-3166. 2019.

OPSTAD, T. B. *et al*. The MMP-9 -1562 C/T polymorphism in the presence of metabolic syndrome increases the risk of clinical events in patients with coronary artery disease. **PLoS One**. v. 9, n.9, p. e106816. 2014.

ORACKI, S. A. *et al*. Plasma cell development and survival. **Immunol Rev**. v. 237, n.1, p. 140-59. 2010.

ORAM, R. A. *et al*. The majority of patients with long-duration type 1 diabetes are insulin microsecretors and have functioning beta cells. **Diabetologia**. v. 57, n.1, p. 187-91. 2014.

ORAM, R. A.; SIMS, E. K.; EVANS-MOLINA, C. Beta cells in type 1 diabetes: mass and function; sleeping or dead? **Diabetologia**. v. 62, n.4, p. 567-577. 2019.

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*. Insulin resistance-related factors, but not glycemia, predict coronary artery disease in type 1 diabetes: 10-year follow-up data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. **Diabetes Care**. v. 26, n.5, p. 1374-9. 2003.

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.

ORDOVAS, J. M. *et al*. Restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein A-I, C-III, A-IV gene locus. Relationships with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery disease. **Atherosclerosis**. v. 87, n.1, p. 75-86. 1991.

OWEN, K. R. *et al*. Assessment of high-sensitivity C-reactive protein levels as diagnostic discriminator of maturity-onset diabetes of the young due to HNF1A mutations. **Diabetes Care**. v. 33, n.9, p. 1919-24. 2010.

OYAKE, T. *et al*. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. **Mol Cell Biol**. v. 16, n.11, p. 6083-95. 1996.

PACAL, L. *et al*. Parameters of oxidative stress, DNA damage and DNA repair in type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Arch Physiol Biochem**. v. 117, n.4, p. 222-30. 2011.

PALMER, T. M. *et al.* Association of plasma uric acid with ischaemic heart disease and blood pressure: mendelian randomisation analysis of two large cohorts. **BMJ**. v. 347, p. f4262. 2013.

PALU, R. A.; THUMMEL, C. S. Sir2 Acts through Hepatocyte Nuclear Factor 4 to maintain insulin Signaling and Metabolic Homeostasis in *Drosophila*. **PLoS Genet**. v. 12, n.4, p. e1005978. 2016.

PAN, Y. *et al.* Apolipoprotein M regulates the orphan nuclear receptor LXR-1 gene expression through binding to its promoter region in HepG2 cells. **Drug Des Devel Ther**. v. 9, p. 2375-82. 2015.

PAPPU, R. *et al.* Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. **Science**. v. 316, n.5822, p. 295-8. 2007.

PARK, Y. J. *et al.* The APOM polymorphism as a novel risk factor for dyslipidaemia in rheumatoid arthritis: a possible shared link between disease susceptibility and dyslipidaemia. **Clin Exp Rheumatol**. v. 31, n.2, p. 180-8. 2013.

PATTERSON, C. C. *et al.* Worldwide estimates of incidence, prevalence and mortality of type 1 diabetes in children and adolescents: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 157, p. 107842. 2019.

PAVLIC, M. *et al.* Triglyceride-rich lipoprotein-associated apolipoprotein C-III production is stimulated by plasma free fatty acids in humans. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 28, n.9, p. 1660-5. 2008.

PAZDERSKA, A. *et al.* A Variant in the BACH2 Gene Is Associated With Susceptibility to Autoimmune Addison's Disease in Humans. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 101, n.11, p. 3865-3869. 2016.

PEETERS, S. A. *et al.* Plasma levels of matrix metalloproteinase-2, -3, -10, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are associated with vascular complications in patients with type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. **Cardiovasc Diabetol**. v. 14, p. 31. 2015.

PEPIN, J. M.; O'NEIL, J. A.; HOFF, H. F. Quantification of apo[a] and apoB in human atherosclerotic lesions. **J Lipid Res**. v. 32, n.2, p. 317-27. 1991.

PIEKE, B. *et al.* Treatment of hypertriglyceridemia by two diets rich either in unsaturated fatty acids or in carbohydrates: effects on lipoprotein subclasses, lipolytic enzymes, lipid transfer proteins, insulin and leptin. **Int J Obes Relat Metab Disord**. v. 24, n.10, p. 1286-96. 2000.

PIERCE, B. L.; AHSAN, H. Genome-wide "pleiotropy scan" identifies HNF1A region as a novel pancreatic cancer susceptibility locus. **Cancer Res**. v. 71, n.13, p. 4352-8. 2011.

- PISCHON, T. *et al.* Non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in the prediction of coronary heart disease in men. **Circulation**. v. 112, n.22, p. 3375-83. 2005.
- PITOCCO, D. *et al.* Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. **Rev Diabet Stud**. v. 7, n.1, p. 15-25. 2010.
- PLAGNOL, V. *et al.* Genome-wide association analysis of autoantibody positivity in type 1 diabetes cases. **PLoS Genet**. v. 7, n.8, p. e1002216. 2011.
- PLOMGAARD, P. *et al.* Apolipoprotein M predicts pre-beta-HDL formation: studies in type 2 diabetic and nondiabetic subjects. **J Intern Med**. v. 266, n.3, p. 258-67. 2009.
- POCIOT, F. *et al.* Genetics of type 1 diabetes: what's next? **Diabetes**. v. 59, n.7, p. 1561-71. 2010.
- POCIOT, F.; LERNMARK, A. Genetic risk factors for type 1 diabetes. **Lancet**. v. 387, n.10035, p. 2331-2339. 2016.
- POLLIN, T. I. *et al.* A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. **Science**. v. 322, n.5908, p. 1702-5. 2008.
- PONTOGLIO, M. Hepatocyte nuclear factor 1, a transcription factor at the crossroads of glucose homeostasis. **J Am Soc Nephrol**. v. 11 Suppl 16, p. S140-3. 2000.
- PONTOGLIO, M. *et al.* Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. **J Clin Invest**. v. 101, n.10, p. 2215-22. 1998.
- POTI, F.; SIMONI, M.; NOFER, J. R. Atheroprotective role of high-density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine-1-phosphate (S1P). **Cardiovasc Res**. v. 103, n.3, p. 395-404. 2014.
- POTJER, T. P. *et al.* Pancreatic cancer-associated gene polymorphisms in a nationwide cohort of p16-Leiden germline mutation carriers; a case-control study. **BMC Res Notes**. v. 8, p. 264. 2015.
- POURVALI, K.; ABBASI, M.; MOTTAGHI, A. Role of Superoxide Dismutase 2 Gene Ala16Val Polymorphism and Total Antioxidant Capacity in Diabetes and its Complications. **Avicenna J Med Biotechnol**. v. 8, n.2, p. 48-56. 2016.
- PRIMAVERA, M.; GIANNINI, C.; CHIARELLI, F. Prediction and Prevention of Type 1 Diabetes. **Front Endocrinol (Lausanne)**. v. 11, p. 248. 2020.
- PRUHOVA, S. *et al.* Two cases of diabetic ketoacidosis in HNF1A-MODY linked to severe dehydration: is it time to change the diagnostic criteria for MODY? **Diabetes Care**. v. 36, n.9, p. 2573-4. 2013.
- PUGIN, J. *et al.* Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. **Am J Respir Cell Mol Biol**. v. 20, n.3, p. 458-64. 1999.

PUGLIESE, A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes mellitus of man: genetic susceptibility and resistance. **Adv Exp Med Biol**. v. 552, p. 170-203. 2004.

PURNELL, J. Q. *et al.* Impact of Excessive Weight Gain on Cardiovascular Outcomes in Type 1 Diabetes: Results From the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study. **Diabetes Care**. v. 40, n.12, p. 1756-1762. 2017.

QI, L. *et al.* Associations of the apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride and HDL cholesterol levels in women with type 2 diabetes. **Atherosclerosis**. v. 192, n.1, p. 204-10. 2007.

QI, Y. *et al.* Loss of sphingosine kinase 1 predisposes to the onset of diabetes via promoting pancreatic beta-cell death in diet-induced obese mice. **FASEB J**. v. 27, n.10, p. 4294-304. 2013.

QIN, W. *et al.* Missense mutation in APOC3 within the C-terminal lipid binding domain of human ApoC-III results in impaired assembly and secretion of triacylglycerol-rich very low density lipoproteins: evidence that ApoC-III plays a major role in the formation of lipid precursors within the microsomal lumen. **J Biol Chem**. v. 286, n.31, p. 27769-80. 2011.

RABBONE, I. *et al.* Diabetic ketoacidosis at the onset of disease during a national awareness campaign: a 2-year observational study in children aged 0-18 years. **Arch Dis Child**. v. 105, n.4, p. 363-366. 2020.

RABKIN, S. W. Differential expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP proteins in thoracic aortic aneurysm - comparison with and without bicuspid aortic valve: a meta-analysis. **Vasa**. v. 43, n.6, p. 433-42. 2014.

RAI, H. *et al.* Association of serum lipids and coronary artery disease with polymorphisms in the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster. **Cogent Med**. v. 3, n.1, p. 1266789. 2016.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radic Biol Med**. v. 50, n.5, p. 567-75. 2011.

RAITAKARI, O. T. *et al.* Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **JAMA**. v. 290, n.17, p. 2277-83. 2003.

RAMOS-DESIMONE, N. *et al.* Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. **J Biol Chem**. v. 274, n.19, p. 13066-76. 1999.

RASSART, E. *et al.* Apolipoprotein D. **Biochim Biophys Acta**. v. 1482, n.1-2, p. 185-98. 2000.

RAVICHANDRAN, S. *et al.* Sphk2(-/-) mice are protected from obesity and insulin resistance. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.** v. 1865, n.3, p. 570-576. 2019.

RAWSHANI, A. *et al.* Excess mortality and cardiovascular disease in young adults with type 1 diabetes in relation to age at onset: a nationwide, register-based cohort study. **Lancet.** v. 392, n.10146, p. 477-486. 2018.

REAVEN, G. Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. **Circulation.** v. 106, n.3, p. 286-8. 2002.

REDONDO-HORCAJO, M. *et al.* Cyclosporine A-induced nitration of tyrosine 34 MnSOD in endothelial cells: role of mitochondrial superoxide. **Cardiovasc Res.** v. 87, n.2, p. 356-65. 2010.

REDONDO, M. J.; FAIN, P. R.; EISENBARTH, G. S. Genetics of type 1A diabetes. **Recent Prog Horm Res.** v. 56, p. 69-89. 2001.

REDONDO, M. J.; STECK, A. K.; PUGLIESE, A. Genetics of type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes.** v. 19, n.3, p. 346-353. 2018.

REINER, A. P. *et al.* Polymorphisms of the HNF1A gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha are associated with C-reactive protein. **Am J Hum Genet.** v. 82, n.5, p. 1193-201. 2008.

REMALEY, A. T.; DAYSPRING, T. D.; WARNICK, G. R. Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Other Cardiovascular Risk Factors. In: ELSEVIER. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.** St. Louis: Elsevier, 2018. p.1888.

REN, K. *et al.* TGF-beta Down-regulates Apolipoprotein M Expression through the TAK-1-JNK-c-Jun Pathway in HepG2 Cells. **Lipids.** v. 52, n.2, p. 109-117. 2017.

REN, K. *et al.* Apolipoprotein M. **Clin Chim Acta.** v. 446, p. 21-9. 2015.

RICHER, M. J.; LANG, M. L.; BUTLER, N. S. T Cell Fates Zipped Up: How the Bach2 Basic Leucine Zipper Transcriptional Repressor Directs T Cell Differentiation and Function. **J Immunol.** v. 197, n.4, p. 1009-15. 2016.

RICHMAN, R. A. *et al.* Simplifying the diagnosis of diabetes insipidus in children. **Am J Dis Child.** v. 135, n.9, p. 839-41. 1981.

RICHTER, D. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry screening of cholelithiasis risk markers in the gene of HNF1alpha. **J Proteomics.** v. 75, n.12, p. 3386-99. 2012.

RICHTER, S. *et al.* Regulation of apolipoprotein M gene expression by MODY3 gene hepatocyte nuclear factor-1alpha: haploinsufficiency is associated with reduced serum apolipoprotein M levels. **Diabetes.** v. 52, n.12, p. 2989-95. 2003.

RIDKER, P. M. *et al.* Loci related to metabolic-syndrome pathways including LEPR, HNF1A, IL6R, and GCKR associate with plasma C-reactive protein: the Women's Genome Health Study. **Am J Hum Genet.** v. 82, n.5, p. 1185-92. 2008.

RIFAI, N. Lipoproteins and apolipoproteins. Composition, metabolism, and association with coronary heart disease. **Arch Pathol Lab Med.** v. 110, n.8, p. 694-701. 1986.

RIVERA, J.; PROIA, R. L.; OLIVERA, A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. **Nat Rev Immunol.** v. 8, n.10, p. 753-63. 2008.

RIWANTO, M. *et al.* Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling. **Circulation.** v. 127, n.8, p. 891-904. 2013.

RIZZO, M.; BERNEIS, K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. **QJM.** v. 99, n.1, p. 1-14. 2006.

RODRIGUEZ-CALVO, T.; RICHARDSON, S. J.; PUGLIESE, A. Pancreas Pathology During the Natural History of Type 1 Diabetes. **Curr Diab Rep.** v. 18, n.11, p. 124. 2018.

ROEP, B. O.; PEAKMAN, M. Antigen targets of type 1 diabetes autoimmunity. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v. 2, n.4, p. a007781. 2012.

ROGLIC, G. *et al.* The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. **Diabetes Care.** v. 28, n.9, p. 2130-5. 2005.

ROGOWICZ-FRONTCZAK, A. *et al.* C-Reactive protein and soluble intracellular adhesion molecule-1 are related to pulse wave reflection in type 1 diabetes 1C-1. **J Diabetes.** v. 6, n.6, p. 577-85. 2014.

ROHRBACH, T. D. *et al.* FTY720/fingolimod decreases hepatic steatosis and expression of fatty acid synthase in diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. **J Lipid Res.** v. 60, n.7, p. 1311-1322. 2019.

ROSBROOK, G. O. *et al.* The structure of the Bach2 POZ-domain dimer reveals an intersubunit disulfide bond. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.** v. 68, n.Pt 1, p. 26-34. 2012.

ROSENSON, R. S. *et al.* HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. **Clin Chem.** v. 57, n.3, p. 392-410. 2011.

ROSENSON, R. S. *et al.* Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. **Circulation.** v. 125, n.15, p. 1905-19. 2012.

ROTHBLAT, G. H. *et al.* Cellular cholesterol flux studies: methodological considerations. **Atherosclerosis.** v. 163, n.1, p. 1-8. 2002.

ROUSSET, X. *et al.* Lecithin cholesterol acyltransferase: an anti- or pro-atherogenic factor? **Curr Atheroscler Rep.** v. 13, n.3, p. 249-56. 2011.

ROYCHOUDHURI, R. *et al.* BACH2 represses effector programs to stabilize T(reg)-mediated immune homeostasis. **Nature.** v. 498, n.7455, p. 506-10. 2013.

RUIXING, Y. *et al.* Interactions of the apolipoprotein C-III 3238C>G polymorphism and alcohol consumption on serum triglyceride levels. **Lipids Health Dis.** v. 9, p. 86. 2010.

RUTTI, S. *et al.* Low- and high-density lipoproteins modulate function, apoptosis, and proliferation of primary human and murine pancreatic beta-cells. **Endocrinology.** v. 150, n.10, p. 4521-30. 2009.

RYE, K. A.; BARTER, P. J. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 24, n.3, p. 421-8. 2004.

SABATTI, C. *et al.* Genome-wide association analysis of metabolic traits in a birth cohort from a founder population. **Nat Genet.** v. 41, n.1, p. 35-46. 2009.

SACKS EDITORIAL BOARD, F. M.; ZHENG, C.; COHN EDITORIAL BOARD, J. S. Complexities of plasma apolipoprotein C-III metabolism. **J Lipid Res.** v. 52, n.6, p. 1067-1070. 2011.

SACKS, F. M. The crucial roles of apolipoproteins E and C-III in apoB lipoprotein metabolism in normolipidemia and hypertriglyceridemia. **Curr Opin Lipidol.** v. 26, n.1, p. 56-63. 2015.

SACKS, F. M. *et al.* VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. **Circulation.** v. 102, n.16, p. 1886-92. 2000.

SADDAR, S. *et al.* Scavenger receptor class B type I is a plasma membrane cholesterol sensor. **Circ Res.** v. 112, n.1, p. 140-51. 2013.

SALES LUIS, M. *et al.* Children with type 1 diabetes of early age at onset - immune and metabolic phenotypes. **J Pediatr Endocrinol Metab.** v. 32, n.9, p. 935-941. 2019.

SANCHEZ, D.; GANFORNINA, M. D. The Lipocalin Apolipoprotein D Functional Portrait: A Systematic Review. **Front Physiol.** v. 12, p. 738991. 2021.

SANDHOLM, N. *et al.* New susceptibility loci associated with kidney disease in type 1 diabetes. **PLoS Genet.** v. 8, n.9, p. e1002921. 2012.

SANS-FONS, M. G. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 and cell division in neuroblastoma cells and bone marrow macrophages. **Am J Pathol.** v. 177, n.6, p. 2870-85. 2010.

SANTIN, I.; DOS SANTOS, R. S.; EIZIRIK, D. L. Pancreatic Beta Cell Survival and Signaling Pathways: Effects of Type 1 Diabetes-Associated Genetic Variants. **Methods Mol Biol.** v. 1433, p. 21-54. 2016.

SANTIN, I. *et al.* PTPN2, a candidate gene for type 1 diabetes, modulates pancreatic beta-cell apoptosis via regulation of the BH3-only protein Bim. **Diabetes**. v. 60, n.12, p. 3279-88. 2011.

SARAVANI, S. *et al.* Association of COL4A3 (rs55703767), MMP-9 (rs17576) and TIMP-1 (rs6609533) gene polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes. **Biomed Rep**. v. 6, n.3, p. 329-334. 2017.

SASONGKO, M. B. *et al.* Serum apolipoproteins are associated with systemic and retinal microvascular function in people with diabetes. **Diabetes**. v. 61, n.7, p. 1785-92. 2012.

SATO, K. *et al.* Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. **J Neurochem**. v. 103, n.6, p. 2610-9. 2007a.

SATO, K. *et al.* HDL-like lipoproteins in cerebrospinal fluid affect neural cell activity through lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 359, n.3, p. 649-54. 2007b.

SATO, K.; OKAJIMA, F. Role of sphingosine 1-phosphate in anti-atherogenic actions of high-density lipoprotein. **World J Biol Chem**. v. 1, n.11, p. 327-37. 2010.

SATTLER, K. *et al.* Defects of High-Density Lipoproteins in Coronary Artery Disease Caused by Low Sphingosine-1-Phosphate Content: Correction by Sphingosine-1-Phosphate-Loading. **J Am Coll Cardiol**. v. 66, n.13, p. 1470-85. 2015.

SBAI, O. *et al.* Differential vesicular distribution and trafficking of MMP-2, MMP-9, and their inhibitors in astrocytes. **Glia**. v. 58, n.3, p. 344-66. 2010.

SBD. Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. **Sociedade Brasileira de Diabetes**. v. p. 2018a.

SBD. Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. **Sociedade Brasileira de Diabetes** v. p. 2018b.

SCANU, A. M.; EDELSTEIN, C. HDL: bridging past and present with a look at the future. **FASEB J**. v. 22, n.12, p. 4044-54. 2008.

SCHAAN, B. D.; HARZHEIM, E.; GUS, I. [Cardiac risk profile in diabetes mellitus and impaired fasting glucose]. **Rev Saude Publica**. v. 38, n.4, p. 529-36. 2004.

SCHAUB, M. A. *et al.* Linking disease associations with regulatory information in the human genome. **Genome Res**. v. 22, n.9, p. 1748-59. 2012.

SCHERER, S. E. *et al.* The finished DNA sequence of human chromosome 12. **Nature**. v. 440, n.7082, p. 346-51. 2006.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Curr Biol**. v. 24, n.10, p. R453-62. 2014.

SCHNELL, O. *et al.* Type 1 diabetes and cardiovascular disease. **Cardiovasc Diabetol**. v. 12, p. 156. 2013.

SCHOONJANS, K. *et al.* Liver receptor homolog 1 controls the expression of the scavenger receptor class B type I. **EMBO Rep**. v. 3, n.12, p. 1181-7. 2002.

SCHRAM, M. T. *et al.* Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes--the EURODIAB Prospective Complications Study. **Diabetologia**. v. 48, n.2, p. 370-8. 2005.

SCHULZE, T. *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P(4)) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17-cell differentiation in a murine model. **FASEB J**. v. 25, n.11, p. 4024-36. 2011.

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.

SCHWAB, K. O. *et al.* Characterization of 33 488 children and adolescents with type 1 diabetes based on the gender-specific increase of cardiovascular risk factors. **Pediatr Diabetes**. v. 11, n.5, p. 357-63. 2010.

SCHWAB, S. R.; CYSTER, J. G. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. **Nat Immunol**. v. 8, n.12, p. 1295-301. 2007.

SCHWAB, S. R. *et al.* Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. **Science**. v. 309, n.5741, p. 1735-9. 2005.

SEGERER, H. *et al.* Diabetic Ketoacidosis at Manifestation of Type 1 Diabetes in Childhood and Adolescence. **Dtsch Arztebl Int**. v. 118, n.22, p. 367-372. 2021.

SEOL, W. *et al.* Inhibition of estrogen receptor action by the orphan receptor SHP (short heterodimer partner). **Mol Endocrinol**. v. 12, n.10, p. 1551-7. 1998.

SEPE, V.; LOVISELLI, A.; BOTTAZZO, G. F. Genetics of type 1A diabetes. **N Engl J Med**. v. 361, n.2, p. 211. 2009.

SHALTOUT, A. A. *et al.* Incidence of type 1 diabetes has doubled in Kuwaiti children 0-14 years over the last 20 years. **Pediatr Diabetes**. v. 18, n.8, p. 761-766. 2017.

SHAN, Z. *et al.* U-Shaped Association between Plasma Manganese Levels and Type 2 Diabetes. **Environ Health Perspect**. v. 124, n.12, p. 1876-1881. 2016.

SHI, T. T. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 regulates mitochondrial function in pancreatic beta-cells. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 495, n.1, p. 860-866. 2018.

SHIH, D. Q. *et al.* Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. **Nat Genet.** v. 27, n.4, p. 375-82. 2001.

SHIH, D. Q. *et al.* Loss of HNF-1alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. **Diabetes.** v. 50, n.11, p. 2472-80. 2001.

SHIH, D. Q.; STOFFEL, M. Dissecting the transcriptional network of pancreatic islets during development and differentiation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 98, n.25, p. 14189-91. 2001.

SHIMODA-MATSUBAYASHI, S. *et al.* Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 226, n.2, p. 561-5. 1996.

SHIOYA, H. *et al.* Preventive and Therapeutic Efficacy of ONO-4641, a Selective Agonist for Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 and 5, in Preclinical Models of Type 1 Diabetes Mellitus. **Biol Pharm Bull.** v. 44, n.2, p. 188-196. 2021.

SHLOMCHIK, M. J.; WEISEL, F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. **Immunol Rev.** v. 247, n.1, p. 52-63. 2012.

SHOULDERS, S. C. *et al.* Variation at the apo AI/CIII/AIV gene complex is associated with elevated plasma levels of apo CIII. **Atherosclerosis.** v. p. 1991.

SHU, Y. *et al.* Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. **J Clin Invest.** v. 117, n.5, p. 1422-31. 2007.

SINGH, K. *et al.* A functional single nucleotide polymorphism -1562C>T in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with type 2 diabetes and diabetic foot ulcers. **Int J Low Extrem Wounds.** v. 12, n.3, p. 199-204. 2013.

SKOURA, A. *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptor-2 function in myeloid cells regulates vascular inflammation and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 31, n.1, p. 81-5. 2011.

SMITH, C. E. *et al.* Apolipoprotein C3 polymorphisms, cognitive function and diabetes in Caribbean origin Hispanics. **PLoS One.** v. 4, n.5, p. e5465. 2009.

SNELL-BERGEON, J. K.; NADEAU, K. Cardiovascular disease risk in young people with type 1 diabetes. **J Cardiovasc Transl Res.** v. 5, n.4, p. 446-62. 2012.

SNIDER, A. J. Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate: regulators in autoimmune and inflammatory disease. **Int J Clin Rheumtol.** v. 8, n.4, p. 2013.

SNIDERMAN, A. D. *et al.* Regulation of plasma LDL: the apoB paradigm. **Clin Sci (Lond).** v. 118, n.5, p. 333-9. 2009.

SNIDERMAN, A. D.; ZHANG, X. J.; CIANFLONE, K. Governance of the concentration of plasma LDL: a reevaluation of the LDL receptor paradigm. **Atherosclerosis**. v. 148, n.2, p. 215-29. 2000.

SOL, E. M.; SUNDSTEN, T.; BERGSTEN, P. Role of MAPK in apolipoprotein CIII-induced apoptosis in INS-1E cells. **Lipids Health Dis**. v. 8, p. 3. 2009.

SONG, J. *et al.* In vivo processing of CXCL5 (LIX) by matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 promotes early neutrophil recruitment in IL-1beta-induced peritonitis. **J Immunol**. v. 190, n.1, p. 401-10. 2013.

SONG, Y. *et al.* Associations of the APOC3 rs5128 polymorphism with plasma APOC3 and lipid levels: a meta-analysis. **Lipids Health Dis**. v. 14, p. 32. 2015.

SORENSEN, I. M. *et al.* Apolipoprotein M in patients with chronic kidney disease. **Atherosclerosis**. v. 275, p. 304-311. 2018.

SOUIDEN, Y. *et al.* MnSOD and GPx1 polymorphism relationship with coronary heart disease risk and severity. **Biol Res**. v. 49, p. 22. 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.

SPAMPINATO, S. F. *et al.* Sphingosine 1 Phosphate at the Blood Brain Barrier: Can the Modulation of S1P Receptor 1 Influence the Response of Endothelial Cells and Astrocytes to Inflammatory Stimuli? **PLoS One**. v. 10, n.7, p. e0133392. 2015.

SPIEGEL, S.; MILSTIEN, S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. **Nat Rev Immunol**. v. 11, n.6, p. 403-15. 2011.

SRAMKOVA, V. *et al.* Apolipoprotein M: a novel adipokine decreasing with obesity and upregulated by calorie restriction. **Am J Clin Nutr**. v. 109, n.6, p. 1499-1510. 2019.

ST-PIERRE, A. C. *et al.* Comparison of various electrophoretic characteristics of LDL particles and their relationship to the risk of ischemic heart disease. **Circulation**. v. 104, n.19, p. 2295-9. 2001.

STAELS, B. *et al.* Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. **J Clin Invest**. v. 95, n.2, p. 705-12. 1995.

STECK, A. K. *et al.* Association of non-HLA genes with type 1 diabetes autoimmunity. **Diabetes**. v. 54, n.8, p. 2482-6. 2005.

STECK, A. K.; REWERS, M. J. Genetics of type 1 diabetes. **Clin Chem**. v. 57, n.2, p. 176-85. 2011.

STECK, A. K. *et al.* Effects of non-HLA gene polymorphisms on development of islet autoimmunity and type 1 diabetes in a population with high-risk HLA-DR,DQ genotypes. **Diabetes**. v. 61, n.3, p. 753-8. 2012.

STOFFERS, D. A. *et al.* Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. **Nat Genet**. v. 17, n.2, p. 138-9. 1997.

STORLING, J.; POCIOT, F. Type 1 Diabetes Candidate Genes Linked to Pancreatic Islet Cell Inflammation and Beta-Cell Apoptosis. **Genes (Basel)**. v. 8, n.2, p. 2017.

SUNDARAM, M. *et al.* Expression of apolipoprotein C-III in McA-RH7777 cells enhances VLDL assembly and secretion under lipid-rich conditions. **J Lipid Res**. v. 51, n.1, p. 150-61. 2010.

SURGUCHOV, A. P. *et al.* Polymorphic Markers in Apolipoprotein C-III Gene Flanking Regions and Hypertriglyceridemia. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. p. 1996.

SUTTON, A. *et al.* The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. **Pharmacogenetics**. v. 13, n.3, p. 145-57. 2003.

SUZUKI, H. *et al.* Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1. **EMBO J**. v. 23, n.13, p. 2544-53. 2004.

SUZUKI, H. *et al.* Cadmium induces nuclear export of Bach1, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1 gene. **J Biol Chem**. v. 278, n.49, p. 49246-53. 2003.

SUZUKI, M. *et al.* Systemic versus coronary levels of inflammation in acute coronary syndromes. **Angiology**. v. 57, n.4, p. 459-63. 2006.

SWAMINATHAN, S. *et al.* BACH2 mediates negative selection and p53-dependent tumor suppression at the pre-B cell receptor checkpoint. **Nat Med**. v. 19, n.8, p. 1014-22. 2013.

SYMEONIDIS, C. *et al.* Matrix metalloproteinase (MMP-2, -9) and tissue inhibitor (TIMP-1, -2) activity in tear samples of pediatric type 1 diabetic patients: MMPs in tear samples from type 1 diabetes. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**. v. 251, n.3, p. 741-9. 2013.

SZPIRER, J. *et al.* Localization of the gene for DNA polymerase epsilon (POLE) to human chromosome 12q24.3 and rat chromosome 12 by somatic cell hybrid panels and fluorescence in situ hybridization. **Genomics**. v. 20, n.2, p. 223-6. 1994.

SZYPOWSKA, A. *et al.* High incidence of diabetic ketoacidosis at diagnosis of type 1 diabetes among Polish children aged 10-12 and under 5 years of age: A multicenter study. **Pediatr Diabetes**. v. 18, n.8, p. 722-728. 2017.

TAGELDEEN, M. M. *et al.* Apolipoprotein M Gene Polymorphism Rs805297 (C-1065A): Association With Type 2 Diabetes Mellitus and Related Microvascular Complications in South Egypt. **Am J Med Sci.** v. 362, n.1, p. 48-55. 2021.

TAKABE, K. *et al.* Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCC1 and ABCG2. **J Biol Chem.** v. 285, n.14, p. 10477-86. 2010.

TAKABE, K. *et al.* "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. **Pharmacol Rev.** v. 60, n.2, p. 181-95. 2008.

TALAYERO, B. *et al.* Obesity favors apolipoprotein E- and C-III-containing high density lipoprotein subfractions associated with risk of heart disease. **J Lipid Res.** v. 55, n.10, p. 2167-77. 2014.

TALMUD, P. J.; HUMPHRIES, S. E. Apolipoprotein C-III gene variation and dyslipidaemia. **Curr Opin Lipidol.** v. 8, n.3, p. 154-8. 1997.

TAO, R. *et al.* Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. **Mol Cell.** v. 40, n.6, p. 893-904. 2010.

TARR, J. M. *et al.* Pathophysiology of diabetic retinopathy. **ISRN Ophthalmol.** v. 2013, p. 343560. 2013.

TASHIRO, S. *et al.* Repression of PML nuclear body-associated transcription by oxidative stress-activated Bach2. **Mol Cell Biol.** v. 24, n.8, p. 3473-84. 2004.

TASKINEN, M. R. *et al.* Dual metabolic defects are required to produce hypertriglyceridemia in obese subjects. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 31, n.9, p. 2144-50. 2011.

TELL, S.; NADEAU, K. J.; ECKEL, R. H. Lipid management for cardiovascular risk reduction in type 1 diabetes. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.** v. 27, n.4, p. 207-214. 2020.

THANABALASINGHAM, G. *et al.* Systematic assessment of etiology in adults with a clinical diagnosis of young-onset type 2 diabetes is a successful strategy for identifying maturity-onset diabetes of the young. **Diabetes Care.** v. 35, n.6, p. 1206-12. 2012.

THANABALASINGHAM, G. *et al.* A large multi-centre European study validates high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) as a clinical biomarker for the diagnosis of diabetes subtypes. **Diabetologia.** v. 54, n.11, p. 2801-10. 2011.

TIAN, C. *et al.* Association of the C47T polymorphism in SOD2 with diabetes mellitus and diabetic microvascular complications: a meta-analysis. **Diabetologia.** v. 54, n.4, p. 803-11. 2011.

TIMPSON, N. J. *et al.* A rare variant in APOC3 is associated with plasma triglyceride and VLDL levels in Europeans. **Nat Commun.** v. 5, p. 4871. 2014.

TODD, J. A. Etiology of type 1 diabetes. **Immunity.** v. 32, n.4, p. 457-67. 2010.

TOMKIN, G. H. Targets for intervention in dyslipidemia in diabetes. **Diabetes Care**. v. 31 Suppl 2, p. S241-8. 2008.

TORQUATO, M. T. *et al.* Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirao Preto (Sao Paulo), Brazil. **Sao Paulo Med J**. v. 121, n.6, p. 224-30. 2003.

TOTH, M. *et al.* Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 308, n.2, p. 386-95. 2003.

TOTH, P. P. *et al.* High-density lipoproteins: a consensus statement from the National Lipid Association. **J Clin Lipidol**. v. 7, n.5, p. 484-525. 2013.

TRUONG, U. T.; MAAHS, D. M.; DANIELS, S. R. Cardiovascular disease in children and adolescents with diabetes: where are we, and where are we going? **Diabetes Technol Ther**. v. 14 Suppl 1, p. S11-21. 2012.

TSAI, H. C.; HAN, M. H. Sphingosine-1-Phosphate (S1P) and S1P Signaling Pathway: Therapeutic Targets in Autoimmunity and Inflammation. **Drugs**. v. 76, n.11, p. 1067-79. 2016.

TSUKUMO, S. *et al.* Bach2 maintains T cells in a naive state by suppressing effector memory-related genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 110, n.26, p. 10735-40. 2013.

TZVETKOV, M. V. *et al.* Effects of OCT1 polymorphisms on the cellular uptake, plasma concentrations and efficacy of the 5-HT(3) antagonists tropisetron and ondansetron. **Pharmacogenomics J**. v. 12, n.1, p. 22-9. 2012.

UEMURA, S. *et al.* Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. **Circ Res**. v. 88, n.12, p. 1291-8. 2001.

URAKAMI, T. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): current perspectives on diagnosis and treatment. **Diabetes Metab Syndr Obes**. v. 12, p. 1047-1056. 2019.

URBINA, E. M. *et al.* Burden of Cardiovascular Risk Factors Over Time and Arterial Stiffness in Youth With Type 1 Diabetes Mellitus: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. **J Am Heart Assoc**. v. 8, n.13, p. e010150. 2019.

USHER-SMITH, J. A. *et al.* Factors associated with the presence of diabetic ketoacidosis at diagnosis of diabetes in children and young adults: a systematic review. **BMJ**. v. 343, p. d4092. 2011.

VAHEDI, G. *et al.* Super-enhancers delineate disease-associated regulatory nodes in T cells. **Nature**. v. 520, n.7548, p. 558-62. 2015.

VAISHYA, S.; SARWADE, R. D.; SESHADRI, V. MicroRNA, Proteins, and Metabolites as Novel Biomarkers for Prediabetes, Diabetes, and Related Complications. **Front Endocrinol (Lausanne)**. v. 9, p. 180. 2018.

VALKOVICOVA, T. *et al.* Novel insights into genetics and clinics of the HNF1A-MODY. **Endocr Regul.** v. 53, n.2, p. 110-134. 2019.

VALLE, I. *et al.* PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. **Cardiovasc Res.** v. 66, n.3, p. 562-73. 2005.

VAN DEN STEEN, P. E. *et al.* Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. **Blood.** v. 96, n.8, p. 2673-81. 2000.

VAN DER VELDE, A. E.; BRUFAU, G.; GROEN, A. K. Transintestinal cholesterol efflux. **Curr Opin Lipidol.** v. 21, n.3, p. 167-71. 2010.

VAN DER VELDE, A. E.; GROEN, A. K. Shifting gears: liver SR-BI drives reverse cholesterol transport in macrophages. **J Clin Invest.** v. 115, n.10, p. 2699-701. 2005.

VAN DOORN, R. *et al.* Sphingosine 1-phosphate receptor 5 mediates the immune quiescence of the human brain endothelial barrier. **J Neuroinflammation.** v. 9, p. 133. 2012.

VAN DUINKERKEN, E. *et al.* Ventral striatum, but not cortical volume loss, is related to cognitive dysfunction in type 1 diabetic patients with and without microangiopathy. **Diabetes Care.** v. 37, n.9, p. 2483-90. 2014.

VAN LINT, P.; LIBERT, C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. **J Leukoc Biol.** v. 82, n.6, p. 1375-81. 2007.

VANDOOREN, J. *et al.* Differential inhibition of activity, activation and gene expression of MMP-9 in THP-1 cells by azithromycin and minocycline versus bortezomib: A comparative study. **PLoS One.** v. 12, n.4, p. e0174853. 2017.

VATS, P. *et al.* Association of Superoxide dismutases (SOD1 and SOD2) and Glutathione peroxidase 1 (GPx1) gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. **Free Radic Res.** v. 49, n.1, p. 17-24. 2015.

VENKATARAMAN, K. *et al.* Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. **Circ Res.** v. 102, n.6, p. 669-76. 2008.

VENTECLEF, N. *et al.* Regulation of anti-atherogenic apolipoprotein M gene expression by the orphan nuclear receptor LRH-1. **J Biol Chem.** v. 283, n.7, p. 3694-701. 2008.

VERGES, B. Cardiovascular disease in type 1 diabetes: A review of epidemiological data and underlying mechanisms. **Diabetes Metab.** v. 46, n.6, p. 442-449. 2020a.

VERGES, B. Dyslipidemia in Type 1 Diabetes: AMaskedDanger. **Trends Endocrinol Metab.** v. 31, n.6, p. 422-434. 2020b.

VERMA, S. *et al.* An Overview of Matrix Metalloproteinase 9 Polymorphism and Gastric Cancer Risk. **Asian Pac J Cancer Prev.** v. 16, n.17, p. 7393-400. 2015.

VERRIJKEN, A. *et al.* A gene variant of PNPLA3, but not of APOC3, is associated with histological parameters of NAFLD in an obese population. **Obesity (Silver Spring).** v. 21, n.10, p. 2138-45. 2013.

VERROTTI, A. *et al.* Autonomic neuropathy in diabetes mellitus. **Front Endocrinol (Lausanne).** v. 5, p. 205. 2014.

VESTERHUS, M. *et al.* Reduced pancreatic volume in hepatocyte nuclear factor 1A-maturity-onset diabetes of the young. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 93, n.9, p. 3505-9. 2008.

VISNER, G. A. *et al.* Regulation of manganese superoxide dismutase: IL-1 and TNF induction in pulmonary artery and microvascular endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 188, n.1, p. 453-62. 1992.

VON ECKARDSTEIN, A.; NOFER, J. R.; ASSMANN, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 21, n.1, p. 13-27. 2001.

VUILLEUMIER, N. *et al.* Pro- or anti-inflammatory role of apolipoprotein A-1 in high-density lipoproteins? **Swiss Med Wkly.** v. 143, p. w13781. 2013.

WADWA, R. P. Cardiovascular disease risk in youth with diabetes mellitus. **Rev Endocr Metab Disord.** v. 7, n.3, p. 197-204. 2006.

WADWA, R. P. *et al.* Awareness and treatment of dyslipidemia in young adults with type 1 diabetes. **Diabetes Care.** v. 28, n.5, p. 1051-6. 2005.

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I. The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy--a review of the evidence. **J Intern Med.** v. 259, n.5, p. 493-519. 2006.

WALLDIUS, G. *et al.* High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. **Lancet.** v. 358, n.9298, p. 2026-33. 2001.

WAN, X. S.; DEVALARAJA, M. N.; ST CLAIR, D. K. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. **DNA Cell Biol.** v. 13, n.11, p. 1127-36. 1994.

WANG, L. I. *et al.* Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk. **J Natl Cancer Inst.** v. 93, n.23, p. 1818-21. 2001.

WANG, W. *et al.* Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. **Circulation**. v. 106, n.12, p. 1543-9. 2002.

WANG, Y.; CHEN, H. Use of Percentiles and Z -Scores in Anthropometry. In: PREEDY, V. R. **Handbook of Anthropometry: Physical Measures of Human Form in Health and Disease**, 2012. p.3107.

WARDEN, B. A.; DUELL, P. B. Volanesorsen for treatment of patients with familial chylomicronemia syndrome. **Drugs Today (Barc)**. v. 54, n.12, p. 721-735. 2018.

WATANABE-MATSUI, M. *et al.* Heme regulates B-cell differentiation, antibody class switch, and heme oxygenase-1 expression in B cells as a ligand of Bach2. **Blood**. v. 117, n.20, p. 5438-48. 2011.

WATERWORTH, D. M. *et al.* Contribution of apolipoprotein C-III gene variants to determination of triglyceride levels and interaction with smoking in middle-aged men. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 20, n.12, p. 2663-9. 2000.

WATSON, C. *et al.* Investigation of association of genetic variant rs3918242 of matrix metalloproteinase-9 with hypertension, myocardial infarction and progression of ventricular dysfunction in Irish Caucasian patients with diabetes: a report from the STOP-HF follow-up programme. **BMC Cardiovasc Disord**. v. 21, n.1, p. 87. 2021.

WEECH, P. K. *et al.* Apolipoprotein D--an atypical apolipoprotein. **Prog Lipid Res**. v. 30, n.2-3, p. 259-66. 1991.

WEGNER, M. *et al.* Association investigation of BACH2 rs3757247 and SOD2 rs4880 polymorphisms with the type 1 diabetes and diabetes long-term complications risk in the Polish population. **Biomed Rep**. v. 3, n.3, p. 327-332. 2015.

WEI, J. *et al.* 17beta-estradiol regulates the expression of apolipoprotein M through estrogen receptor alpha-specific binding motif in its promoter. **Lipids Health Dis**. v. 16, n.1, p. 66. 2017.

WEIGERT, A.; OLESCH, C.; BRUNE, B. Sphingosine-1-Phosphate and Macrophage Biology-How the Sphinx Tames the Big Eater. **Front Immunol**. v. 10, p. 1706. 2019.

WHITE, U.; RAVUSSIN, E. Dynamics of adipose tissue turnover in human metabolic health and disease. **Diabetologia**. v. 62, n.1, p. 17-23. 2019.

WIECZOREK, E. *et al.* MMP, VEGF and TIMP as prognostic factors in recurring bladder cancer. **Clin Biochem**. v. 48, n.18, p. 1235-40. 2015.

WILKERSON, B. A. *et al.* Sphingosine 1-phosphate (S1P) carrier-dependent regulation of endothelial barrier: high density lipoprotein (HDL)-S1P prolongs endothelial barrier enhancement as compared with albumin-S1P via effects on levels, trafficking, and signaling of S1P1. **J Biol Chem**. v. 287, n.53, p. 44645-53. 2012.

WINN, R. K.; HARLAN, J. M. The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases. **J Thromb Haemost**. v. 3, n.8, p. 1815-24. 2005.

WOJCIK, M. *et al.* Incidence of type 1 diabetes mellitus during 26 years of observation and prevalence of diabetic ketoacidosis in the later years. **Eur J Pediatr**. v. 174, n.10, p. 1319-24. 2015.

WOLFRUM, C. *et al.* Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. **Nature**. v. 432, n.7020, p. 1027-32. 2004.

WOLFRUM, C. *et al.* Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 100, n.20, p. 11624-9. 2003.

WOLFRUM, C. *et al.* Foxa2 activity increases plasma high density lipoprotein levels by regulating apolipoprotein M. **J Biol Chem**. v. 283, n.24, p. 16940-9. 2008.

WOLFRUM, C.; POY, M. N.; STOFFEL, M. Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. **Nat Med**. v. 11, n.4, p. 418-22. 2005.

WONG, F. S. How does B-cell tolerance contribute to the protective effects of diabetes following induced mixed chimerism in autoimmune diabetes? **Diabetes**. v. 63, n.6, p. 1855-7. 2014.

WOO, M. M. *et al.* Elevated Leukocyte Azurophilic Enzymes in Human Diabetic Ketoacidosis Plasma Degrade Cerebrovascular Endothelial Junctional Proteins. **Crit Care Med**. v. 44, n.9, p. e846-53. 2016.

WU, H. D. *et al.* Association of genetic polymorphisms in matrix metalloproteinase-9 and coronary artery disease in the Chinese Han population: a case-control study. **Genet Test Mol Biomarkers**. v. 17, n.9, p. 707-12. 2013.

WU, X. *et al.* Apolipoprotein M promoter polymorphisms alter promoter activity and confer the susceptibility to the development of type 1 diabetes. **Clin Biochem**. v. 42, n.1-2, p. 17-21. 2009.

WU, Y. *et al.* Interactions of Environmental Factors and APOA1-APOC3-APOA4-APOA5 Gene Cluster Gene Polymorphisms with Metabolic Syndrome. **PLoS One**. v. 11, n.1, p. e0147946. 2016.

XIA, Y. *et al.* Incidence and trend of type 1 diabetes and the underlying environmental determinants. **Diabetes Metab Res Rev**. v. 35, n.1, p. e3075. 2019.

XIONG, Y.; HLA, T. S1P control of endothelial integrity. **Curr Top Microbiol Immunol**. v. 378, p. 85-105. 2014.

XU, N. *et al.* Down-regulation of apolipoprotein M expression is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase in HepG2 cells. **Biochim Biophys Acta**. v. 1761, n.2, p. 256-60. 2006.

XU, N.; DAHLBACK, B. A novel human apolipoprotein (apoM). **J Biol Chem.** v. 274, n.44, p. 31286-90. 1999.

XU, N. *et al.* Transforming growth factor-beta down-regulates apolipoprotein M in HepG2 cells. **Biochim Biophys Acta.** v. 1683, n.1-3, p. 33-7. 2004.

XU, N.; NILSSON-EHLE, P.; AHREN, B. Correlation of apolipoprotein M with leptin and cholesterol in normal and obese subjects. **J Nutr Biochem.** v. 15, n.10, p. 579-82. 2004.

XU, N. *et al.* Both leptin and leptin-receptor are essential for apolipoprotein M expression in vivo. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 321, n.4, p. 916-21. 2004.

XU, N. *et al.* Effects of platelet-activating factor, tumor necrosis factor, and interleukin-1alpha on the expression of apolipoprotein M in HepG2 cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 292, n.4, p. 944-50. 2002.

XU, W. W. *et al.* A genetic variant of apolipoprotein M increases susceptibility to coronary artery disease in a Chinese population. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v. 35, n.5-6, p. 546-51. 2008.

XU, Y. *et al.* An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. **DNA Cell Biol.** v. 18, n.9, p. 709-22. 1999.

YABLUCHANSKIY, A. *et al.* Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. **Physiology (Bethesda).** v. 28, n.6, p. 391-403. 2013.

YALCINKAYA, M.; VON ECKARDSTEIN, A. Apolipoprotein M and Sphingosine-1-Phosphate: A Potentially Antidiabetic Tandem Carried by HDL. **Diabetes.** v. 69, n.5, p. 859-861. 2020.

YAMAGATA, K. Roles of HNF1alpha and HNF4alpha in pancreatic beta-cells: lessons from a monogenic form of diabetes (MODY). **Vitam Horm.** v. 95, p. 407-23. 2014.

YANG, L. *et al.* The Critical Role of Bach2 in Shaping the Balance between CD4(+) T Cell Subsets in Immune-Mediated Diseases. **Mediators Inflamm.** v. 2019, p. 2609737. 2019.

YANG, L.; LI, T. LncRNA TUG1 regulates ApoM to promote atherosclerosis progression through miR-92a/FXR1 axis. **J Cell Mol Med.** v. 24, n.15, p. 8836-8848. 2020.

YANG, L.; ZHAO, S. Effect of simvastatin on the expression and regulation mechanism of apolipoprotein M. **Int J Mol Med.** v. 29, n.3, p. 510-4. 2012.

YAO MATTISSON, I.; CHRISTOFFERSEN, C. Apolipoprotein M and its impact on endothelial dysfunction and inflammation in the cardiovascular system. **Atherosclerosis.** v. 334, p. 76-84. 2021.

YAO, S. *et al.* Apolipoprotein M promotes cholesterol uptake and efflux from mouse macrophages. **FEBS Open Bio**. v. 11, n.6, p. 1607-1620. 2021.

YAO, Z. Human apolipoprotein C-III - a new intrahepatic protein factor promoting assembly and secretion of very low density lipoproteins. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**. v. 12, n.2, p. 133-40. 2012.

YATOMI, Y. Sphingosine 1-phosphate in vascular biology: possible therapeutic strategies to control vascular diseases. **Curr Pharm Des**. v. 12, n.5, p. 575-87. 2006.

YOKOYAMA, S. Assembly of high-density lipoprotein. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 26, n.1, p. 20-7. 2006.

YU, X. *et al.* SENP3 maintains the stability and function of regulatory T cells via BACH2 deSUMOylation. **Nat Commun**. v. 9, n.1, p. 3157. 2018.

YU, Y. *et al.* Apolipoprotein M gene single nucleotide polymorphisms discovery in patients with chronic obstructive pulmonary disease and determined by the base-quenched probe technique. **Gene**. v. 637, p. 9-13. 2017.

YURUK YILDIRIM, Z. *et al.* Urine Levels of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in Children with Type 1 Diabetes Mellitus. **J Clin Res Pediatr Endocrinol**. v. 11, n.2, p. 157-163. 2019.

ZANNIS, V. I. *et al.* Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes. **Front Biosci**. v. 6, p. D456-504. 2001a.

ZANNIS, V. I. *et al.* Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes in vitro and in vivo. **Curr Opin Lipidol**. v. 12, n.2, p. 181-207. 2001b.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic Biol Med**. v. 33, n.3, p. 337-49. 2002.

ZHANG, H.; SONG, B.; HE, S. Interleukin 29 activates expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in macrophages via tolllike receptor 2. **Mol Med Rep**. v. 17, n.6, p. 8363-8368. 2018.

ZHANG, P. H. *et al.* A single-nucleotide polymorphism C-724 /del in the proter region of the apolipoprotein M gene is associated with type 2 diabetes mellitus. **Lipids Health Dis**. v. 15, p. 142. 2016.

ZHANG, X. *et al.* Hyperglycemia down-regulates apolipoprotein M expression in vivo and in vitro. **Biochim Biophys Acta**. v. 1771, n.7, p. 879-82. 2007.

ZHANG, X. *et al.* Liver X receptor agonist downregulates hepatic apoM expression in vivo and in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 371, n.1, p. 114-7. 2008.

ZHANG, Y. *et al.* Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. **J Clin Invest.** v. 115, n.10, p. 2870-4. 2005.

ZHANG, Z. *et al.* Proteolytic Cleavage of AMPK α and Intracellular MMP9 Expression Are Both Required for TLR4-Mediated mTORC1 Activation and HIF-1 α Expression in Leukocytes. **J Immunol.** v. 195, n.5, p. 2452-60. 2015.

ZHANG, Z.; CHU, G.; YIN, R. X. Apolipoprotein M T-778C polymorphism is associated with serum lipid levels and the risk of coronary artery disease in the Chinese population: a meta-analysis. **Lipids Health Dis.** v. 12, p. 135. 2013.

ZHAO, D. *et al.* Association of apolipoprotein M gene polymorphisms with ischemic stroke in a Han Chinese population. **J Mol Neurosci.** v. 43, n.3, p. 370-5. 2011.

ZHAO, Z. *et al.* FTY720 normalizes hyperglycemia by stimulating beta-cell in vivo regeneration in db/db mice through regulation of cyclin D3 and p57(KIP2). **J Biol Chem.** v. 287, n.8, p. 5562-73. 2012.

ZHENG, C. *et al.* Statins suppress apolipoprotein CIII-induced vascular endothelial cell activation and monocyte adhesion. **Eur Heart J.** v. 34, n.8, p. 615-24. 2013.

ZHENG, C. *et al.* Apolipoprotein C-III and the metabolic basis for hypertriglyceridemia and the dense low-density lipoprotein phenotype. **Circulation.** v. 121, n.15, p. 1722-34. 2010.

ZHENG, C. *et al.* Rapid turnover of apolipoprotein C-III-containing triglyceride-rich lipoproteins contributing to the formation of LDL subfractions. **J Lipid Res.** v. 48, n.5, p. 1190-203. 2007.

ZHENG, L. *et al.* Decreased activities of apolipoprotein m promoter are associated with the susceptibility to coronary artery diseases. **Int J Med Sci.** v. 11, n.4, p. 365-72. 2014.

ZHOU, J. W. *et al.* Apolipoprotein M gene (APOM) polymorphism modifies metabolic and disease traits in type 2 diabetes. **PLoS One.** v. 6, n.2, p. e17324. 2011.

ZHOU, Y. *et al.* The Bach Family of Transcription Factors: A Comprehensive Review. **Clin Rev Allergy Immunol.** v. 50, n.3, p. 345-56. 2016.

ZHU, C. *et al.* TO901317 regulating apolipoprotein M expression mediates via the farnesoid X receptor pathway in Caco-2 cells. **Lipids Health Dis.** v. 10, p. 199. 2011.

ZHU, C. H. *et al.* A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase expression. **J Biol Chem.** v. 276, n.17, p. 14407-13. 2001.

ZIEGLER, A. G.; NEPOM, G. T. Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. **Immunity.** v. 32, n.4, p. 468-78. 2010.

ZOU, X. *et al.* Manganese superoxide dismutase (SOD2): is there a center in the universe of mitochondrial redox signaling? **J Bioenerg Biomembr.** v. 49, n.4, p. 325-333. 2017.

ZOUALI, M. Transcriptional and metabolic pre-B cell receptor-mediated checkpoints: implications for autoimmune diseases. **Mol Immunol.** v. 62, n.2, p. 315-20. 2014.

ANEXO 1

Termo de aprovação do comitê de ética.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -									
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP									
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA									
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:									
Versão: 3									
CAAE: 24678613.6.0000.0102									
Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas									
Patrocinador Principal: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas									
DADOS DO PARECER									
Número do Parecer: 655.477									
Data da Relatoria: 21/05/2014									
Apresentação do Projeto:									
AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES LABORATORIAIS E MOLECULARES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES SAUDÁVEIS E PORTADORAS DE DIABETES									
Autora: Dra Fabiane Gomes de Moraes Rego. Equipe da Pesquisa: Aline Borsato Hauser, Geraldo Picheth, Letícia Carneiro Gomes, Railson Henneberg, SUZANA NESI FRANÇA.									
Objetivo da Pesquisa:									
<p>Dosar os biomarcadores de controle glicêmico com ênfase no 1,5 anidroglicitol e albumina glicada, perfil lipídico, função renal, função hepática, função hematológica, metabolismo do cálcio e vitamina D e anticorpos relacionados ao desenvolvimento do diabetes em crianças e adolescentes de escolas Estaduais de Curitiba e pacientes diabéticos e seus familiares atendidos pelo Hospital de Clínicas da UFPR.</p> <p>Determinar as frequências genotípicas e alélicas de polimorfismos genéticos relacionados ao diabetes e suas complicações. Associar as variações genéticas estudadas com os biomarcadores em estudo, com ênfase nos associados ao controle glicêmico e no perfil lipídico. Buscar novos biomarcadores laboratoriais ou moleculares para o diagnóstico precoce do diabetes em crianças e adolescentes.</p>									
<table border="0"> <tr> <td>Endereço: Rua Padre Camargo, 280</td> <td>CEP: 80.060-240</td> </tr> <tr> <td>Bairro: 2º andar</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: PR</td> <td>Município: CURITIBA</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (41)3360-7259</td> <td>E-mail: cometica.saude@ufpr.br</td> </tr> </table>		Endereço: Rua Padre Camargo, 280	CEP: 80.060-240	Bairro: 2º andar		UF: PR	Município: CURITIBA	Telefone: (41)3360-7259	E-mail: cometica.saude@ufpr.br
Endereço: Rua Padre Camargo, 280	CEP: 80.060-240								
Bairro: 2º andar									
UF: PR	Município: CURITIBA								
Telefone: (41)3360-7259	E-mail: cometica.saude@ufpr.br								

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 655.477

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto em questão prevê riscos para os pacientes como algum desconforto inerente à punção venosa, bem como riscos associados a coleta da amostra de sangue como hematomas e irritações locais e o desconforto em coletar os dados antropométricos das crianças e adolescentes que serão o grupo controle. Para os pesquisadores, não haverá riscos visto que os procedimentos analíticos a serem empregados são de domínio dos mesmos. Os procedimentos técnicos que serão empregados estão bem estabelecidos na literatura e não há relatos de riscos bem como dano ao meio ambiente. Há descrição de que os materiais utilizados no projeto serão armazenados, lavados e/ou descartados seguindo as normas vigentes de biossegurança e proteção ao meio ambiente. O projeto apresenta benefícios que permitirão a avaliação da utilização de biomarcadores que não estão contemplados na rotina laboratorial, permitindo novas perspectivas de acurácia no diagnóstico, monitoramento e conhecimento das características do diabetes no Brasil, beneficiando os afetados pela patologia, os profissionais de saúde envolvidos no processo de tratamento e o sistema público de saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta cunho relevante haja visto que o diabetes é uma patologia que afeta 8% da população e principalmente o controle glicêmico é difícil principalmente em crianças e adolescentes. A assertiva de que é necessário estudar e avaliar múltiplos e diferentes marcadores em conjunto para a extração de elementos representativos que possam ser utilizados como biomarcadores de risco e ou proteção associados ao diabetes são o ponto central desta pesquisa. Portanto, novos biomarcadores proteicos e genômicos, associados a marcadores clássicos do diabetes como glicemia de jejum, glicemia pós-prandial, 1,5 anidroglicitol (1,5AG), albumina glicada (AG), insulina e hemoglobina glicada, são elementos centrais nessa pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos exigidos por este CEP foram anexados. anexada a declaração final modelo CONEP, onde o Coparticipante declara ter lido e concordar com o Parecer deste CEP/SD, lembrando que a Resolução em vigor é a 466/2012/CNS, em substituição a 196/96/CNS.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento,

Endereço: Rua Padre Camargo, 280
Bairro: 2º andar CEP: 80.060-240
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 655.477

encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS)

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa, tanto o participante como o pesquisador deverão rubricar todas as páginas do TCLE, opondo assinaturas na última página do referido Termo (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

CURITIBA, 21 de Maio de 2014

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 280	CEP: 80.060-240
Bairro: 2º andar	
UF: PR Município: CURITIBA	
Telefone: (41)3360-7259	E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2

Termo de consentimento livre e esclarecido para participantes menores (A), os quais eram assinados pelos pais ou responsáveis legais, e para participantes acima de 12 anos (B), respectivamente.

A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Fabiane Gomes de Moraes Rego, Dr Suzana Nesi França e Geraldo Picheth, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o seu filho menor de idade, a participar de um estudo intitulado "AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES LABORATORIAIS E MOLECULARES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES SAUDÁVEIS E PORTADORAS DE *DIABETES MELLITUS*", que vai avaliar o perfil bioquímico e molecular do seu filho. É através de pesquisas como esta que ocorrem os avanços na medicina e sua participação é de fundamental importância.

- a) O objetivo desta pesquisa é estudar os aspectos genéticos envolvidos com o diabetes para uma melhor compreensão desta doença. Pesquisas como esta podem ajudar no desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico e tratamento.
- b) Caso você autorize a participação de seu filho na pesquisa, os dados pessoais biométricos (como idade, peso, altura) serão necessários. Além disso, será necessário coletar uma amostra do sangue dele.
- c) O sangue do seu filho será coletado durante a consulta de rotina do irmão (diabético tipo 1) pela equipe de coletadores do Serviço de Endocrinologia Pediátrica e Adolescência do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, com a necessidade de coleta específica para a pesquisa.
- d) É possível que ele experimente algum desconforto, principalmente relacionado à agulhada da coleta de sangue.
- e) Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser: dor e aparecimento de pequenos hematomas no local da coleta de sangue, que serão totalmente avaliados e se necessário tratados sob a responsabilidade da equipe de coletadores do Hospital de Clínicas ou pela Dr Suzana Nesi França.
- f) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: 1) melhor conhecimento do perfil bioquímico e molecular dos adolescentes 2) a expectativa do desenvolvimento de novos ensaios laboratoriais que permitam um melhor diagnóstico e tratamento de doenças ligadas a adolescentes. No entanto, nem sempre ele será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- g) Caso você autorize, o sangue de seu filho menor de idade será armazenado corretamente e poderá ser utilizado em outras pesquisas semelhantes a esta, que buscam aumentar o conhecimento sobre doenças e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Toda nova pesquisa a ser feita com o material dele armazenado, será submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, e a cada nova pesquisa, o sujeito será contatado para consentir novo uso de sua amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.
- h) A amostra de sangue de seu filho menor de idade será armazenada por até 10 anos, mas poderá ser descartada devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade. Neste caso, a amostra será colocada em recipientes apropriados e será descartada seguindo normas bem definidas, sem causar riscos a saúde de ninguém, tampouco ao meio ambiente.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável _____

Orientador _____ Orientado _____

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
 Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

- i) Os pesquisadores responsáveis por este estudo: Fabiane Gomes de Moraes Rego (rego@ufpr.br), Geraldo Picheth (geraldopicheth@ufpr.br) e Dr Suzana Nesi França (snesifranca@hotmail.com); os farmacêuticos poderão ser contatados de segunda a sexta-feira, das 14 às 18 h, no Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná, sito à Rua Prefeito Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, ou pelo telefone (41) 3360-4068, e a médica poderá ser contatada de segunda a sexta-feira, das 14 às 18 h, no consultório Endocrinologia Pediátrica e Adolescente na rua Bruno Filgueira 2495 – Centro, Curitiba – PR, ou pelo telefone (41) 3339-0370, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.
- j) A participação do seu filho neste estudo é voluntária e se você não quiser mais que ele faça parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.
- k) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito através de códigos, para que a identidade dele seja preservada e seja mantida a confidencialidade.
- l) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames laboratoriais) não são de sua responsabilidade e pela participação do seu filho no estudo ele não receberá qualquer valor em dinheiro. Ele terá a garantia de que problemas como: hematomas e dor no local da punção para coleta do sangue decorrentes do estudo serão tratados pela próprio equipe de pesquisadores.
- m) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá o nome dele, e sim um código.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei que meu filho participe. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper a participação do meu filho a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete o tratamento dele. Eu entendi o que o meu filho não pode fazer durante a pesquisa e fui informado que meu filho será atendido sem custos se ele apresentar algum problema dos relacionados no item "e".

Eu concordo voluntariamente na participação do meu filho neste estudo, e autorizo a coleta, o armazenamento e guarda do sangue dele para futuras pesquisas, sabendo que a cada nova pesquisa, serei contatado(a) para consentir ou não o novo uso da amostra do meu filho, o qual será formalizado através de um TCLE específico.

(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)

Local e data

Assinatura do Pesquisador

<p>Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br</p>
--

B**TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO**

Adolescentes maiores de 12 anos e menores de 18 anos

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES LABORATORIAIS E MOLECULARES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES SAUDÁVEIS E PORTADORAS DE DIABETES MELLITUS

Responsável: Fabiane Gomes de Moraes Rego (orientador)

Local da Pesquisa: Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná.

Endereço: Rua Prefeito Lothário Meissner, 632 – Campus Jardim Botânico, Curitiba – PR

O que significa assentimento?

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade (entre 12 e 18 anos), para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informação ao Paciente:

O objetivo desta pesquisa é estudar o perfil bioquímico e molecular de adolescentes das escolas de Curitiba visando uma melhor compreensão de doenças que possam afetar estes. Pesquisas como esta podem ajudar no desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico e tratamento.

Caso você participe da pesquisa, os dados pessoais biométricos (como idade, peso, altura) serão necessários. Além disso, será necessário coletar uma amostra do sangue sua.

O sangue será coletado durante a visita na sua escola pela nossa equipe de pesquisadores, com necessidade de coleta específica para a pesquisa.

É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado à agulhada da coleta de sangue.

Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser: dor e aparecimento de pequenos hematomas no local da coleta de sangue, que desaparecerão com o tempo.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde/UFRP.
Parecer CEP/SD-PB nº 655/477
na data de 23/05/2014

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Os benefícios esperados com essa pesquisa são: 1) melhor conhecimento do perfil bioquímico e molecular dos adolescentes 2) a expectativa do desenvolvimento de novos ensaios laboratoriais que permitam um melhor diagnóstico e tratamento de doenças ligadas a adolescentes. No entanto, nem sempre ele será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

Caso você autorize, seu sangue será armazenado corretamente e poderá ser utilizado em outras pesquisas semelhantes a esta, que buscam aumentar o conhecimento sobre doenças e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material armazenado, será submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, e a cada nova pesquisa, o sujeito será contatado para consentir novo uso de sua amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.

Sua amostra de sangue será armazenada por até 10 anos, mas poderá ser descartada devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade. Neste caso, a amostra será colocada em recipientes apropriados e será descartada seguindo normas bem definidas, sem causar riscos a saúde de ninguém, tampouco ao meio ambiente.

A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito através de códigos, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames laboratoriais) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas como: hematomas e dor no local da punção para coleta do sangue decorrentes do estudo serão tratados pela própria equipe de pesquisadores

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Rubricas:
 Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____
 Pesquisador Responsável ou quem aplicou o
 TCLE _____

Contato para dúvidas

Se você ou os responsáveis por você tiver(em) dúvidas com relação ao estudo, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve contatar o(a) Investigador(a) do estudo ou membro de sua equipe Os pesquisadores responsáveis por este estudo são: Fabiane Gomes de Moraes Rego (rego@ufpr.br), Geraldo Picheth (geraldopicheth@ufpr.br) e Aline Borsato Hauser (alinehauser@ufpr.br);farmacêuticos, poderão ser contatados

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos do Setor de Ciências da
 Saúde/UFPR,
 Parecer CEP/SD-PB.nº 655477
 na data de 21/05/2014

de segunda a sexta-feira, das 14 às 18h, no Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná, sito à Rua Prefeito Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, ou pelo telefone (41) 3360-4068, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7251. O CEP é constituído por um grupo de profissionais de diversas áreas, com conhecimentos científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada da pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento DE ASSENTIMENTO INFORMADO.

NOME DO ADOLESCENTE	ASSINATURA	DATA
---------------------	------------	------

NOME DO INVESTIGADOR	ASSINATURA	DATA
----------------------	------------	------

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240
Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Setor de Ciências da
Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB.nº 655477
na data de 21/05/2014

ANEXO 3

Questionário aplicado aos indivíduos participantes da pesquisa.

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? _____

ANEXO 4

PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE *apoM*. Gráfico de discriminação alélica do SNP rs805297. Em azul estão amostras homocigotas para o alelo C (CC); em verde, amostras heterocigotas com genótipo CA e em vermelho, amostras homocigotas para o alelo A (AA).

Allelic Discrimination Plot