



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

**MicroRNA COMO BIOMARCADORES PARA IDENTIFICAÇÃO DE INDIVÍDUOS
COM PRÉ-DIABETES E DIAGNÓSTICO PRECOCE DO DIABETES.**

VICTOR DE BARROS SERRANO NEVES

Salvador - Ba

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

**MicroRNA COMO BIOMARCADORES PARA IDENTIFICAÇÃO DE INDIVÍDUOS
COM PRÉ-DIABETES E DIAGNÓSTICO PRECOCE DO DIABETES.**

VICTOR DE BARROS SERRANO NEVES

Orientadora: Dra. Simone Garcia Macambira

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-graduação
Multicêntrico em Bioquímica
e Biologia Molecular para
obtenção de Título de Mestre.

Salvador – Ba

2020

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe por ter sido minha maior incentivadora a alcançar o título de mestre. Aos meus irmãos e amigos por entenderem a minha ausência durante esse período e nunca me abandonarem. A Raquel, por ter aturado os bastidores por trás do desafio de se fazer ciência.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Dra. Simone Macambira por ter aceito esse desafio comigo e me apresentado ao mundo da bioinformática, pela dedicação e carinho que me foi concedido ao longo desses anos. A Dra. Natália Tavares, cujas brilhantes contribuições contribuíram para manter o foco nos nossos objetivos. A Ma. Sara Araújo, por toda a paciência e por me ensinar praticamente tudo que sei hoje. Ao meu colega Thiago dos Santos, pelo compartilhamento dos conhecimentos adquiridos ao longo desses 2 anos.

Sou grato também a Alexandra Elbakyan por ter mudado os rumos da ciência e contribuir para o seu desenvolvimento.

Por último agradeço ao PMBqBm por ter me acolhido e expandido minha mente para um novo mundo de oportunidades. A FAPESB por ter acreditado no meu projeto e ter me financiado e a FIOCRUZ, cuja parceria foi essencial para o desenvolvimento do meu projeto.

Resumo:

Introdução: O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica decorrente de defeitos na produção, secreção ou sinalização da insulina. Pré-diabetes é um estado sem sintomas onde o indivíduo apresenta níveis de glicemia de jejum entre 100 - 120mg/dl e hemoglobina glicada entre 5,7 e 6,5%. Antes definido como um estado latente, atualmente é definido como um período de risco para nefropatia, neuropatia e destruição das células β -pancreáticas. Neste contexto, torna-se relevante a identificação de marcadores biológicos, tais como microRNA (miRNA), para este estado patológico contribuindo para o diagnóstico precoce. Os miRNA são pequenos RNA que não codificam proteínas, mas são considerados importantes reguladores pós-transcricionais. São apontados como potenciais biomarcadores, uma vez que tem seus níveis de expressão alterados em função do desenvolvimento ou do grau de severidade de diversas doenças como diabetes, câncer e esquizofrenia. No presente estudo, visamos identificar um perfil de expressão de miRNA que pode viabilizar o diagnóstico precoce do pré-diabetes. **Resultados:** Após o levantamento dos transcriptomas publicamente disponíveis em NCBI GEO dataset, um transcriptoma atendeu aos critérios de inclusão deste estudo. A partir deste, foram identificados trinta e três miRNA com perfil de expressão aumentado no grupo pré-diabético em relação ao controle ($FC \geq 1,5$ p -valor $\leq 0,05$) e dois no grupo diabético ($FC \geq 1,5$ p -valor $\leq 0,05$). A rede de interação gerada pelo programa Cytoscape mostrou os miRNAs selecionados e seus alvos diferencialmente expressos no transcriptoma de validação. Cinco destes miRNA apresentaram maiores valores de centralidade na rede de interação miRNA-mRNA (let-7a, Let-7b, miR-106b, miR-93 e miR-17). Estes miRNA apresentaram maior sensibilidade e especificidade para o pré-diabetes (AUC = 0,794). **Conclusão:** Os cinco miRNA identificados estão envolvidos em diversas vias intracelulares relacionadas à resistência insulínica e destruição das células β -pancreática e estão diferencialmente modulados no transcriptoma analisado neste estudo, podendo ser apontados como biomarcadores exploratórios promissores para diagnóstico precoce de DM2.

Palavras-chaves: Diabetes; Mecanismos moleculares; Expressão gênica; Transcriptoma.

ABSTRACT

Introduction: Diabetes Mellitus (DM) is a chronic disease due to impairment in insulin signaling, secretion or production. Prediabetes is an asymptomatic state in which subjects fasting glucose is between 100-120mg/dl and glycated hemoglobin is at the range of 5,7-6,5%. Previously defined as a latent state, now it is recognized as a risk factor for nephropathy and neuropathy development, and also for β -cell destruction. In this context, the identification of biological markers that have disrupted expression in pathological states can contribute to an early diagnosis. microRNAs (miRNA) are non-coding RNA, considered important in the post-translation regulation of genes. They are pointed out as potential biomarkers, since their expression level becomes altered due to the development or aggravation of many diseases such as diabetes, cancer, and schizophrenia. The present study aimed to identify a miRNA expression profile able to ensure an accurate early diagnosis of prediabetes. Publicly available transcriptomes were analyzed through bioinformatics tools. **Results:** After screening conducted at NCBI GEO datasets, one dataset matched our inclusion criteria. From which thirty-three miRNA were significantly upregulated in prediabetic subjects versus control ($FC > 1,5$ $p\text{-valor} \leq 0,05$) and two were upregulated in the diabetic versus control group ($FC > 1,5$ $p\text{-valor} \leq 0,05$). A miRNA-mRNA network was created using the upregulated miRNA and its regulated targets in the validation transcriptome using the Cytoscape software. Five miRNAs presented a greater centrality score from the miRNA-mRNA network. In which two (miR-93 and Let-7a) had better values for sensibility and specificity (AUC = 0,829 e 0,824 respectively). **Conclusion:** The five miRNAs identified are involved in several intracellular pathways related to insulin resistance, destruction of β -pancreatic cells and are differentially expressed in the dataset analyzed in this study, which can be proposed as promising exploratory biomarkers for the early diagnosis of prediabetes.

Key-words: Diabetes; Molecular Mechanism; Gene Expression; Transcriptome.

Lista de Figuras

Figura 1 Mecanismos moleculares do DM2.....	16
Figura 2: Mecanismo glicotoxicidade decorrido do aumento do influxo da via das Hexosaminas.O aumento da atividade da GFAT leva ao aumento da OGT aumento a quantidade de proteínas glicosiladas (Adaptada de Nie & Yi, 2019).....	17
Figura 3: Mecanismos de excreção de insulina.....	20
Figura 4: Sinalização intracelular da ação da insulina após ligar-se ao seu receptor.	21
Figura 5: Biogênese de miRNA.....	27
Figura 6: Fluxograma de seleção do transcriptoma.	33
Figura 7: Fluxograma das análises conduzidas no transcriptoma para identificação dos GDE e MDE.....	36
Figura 8: Fluxograma conduzido para identificação dos biomarcadores.....	37
Figura 9: Comparação das expressões dos miRNA entre os grupos Pré-diabéticos (PRE), Diabético (DM) e Controle (CON).. ..	39
Figura 10: Rede de interações entre miRNA e mRNA.	40
Figura 11: Análise de enriquecimento de conjunto de genes através da plataforma Enrichr.....	41
Figura 12 Hub network de maior importância segundo MCC.	42
Figura 13: Análise de enriquecimento de conjunto de genes obtido através do GSEA.	43
Figura 14: Análise de sensibilidade e 1-especificidade do conjunto de miRNA hub identificados pelo cytohubba	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC	Acidente CardioVascular
ATP	Adenosina Tri Fosfato
ADA	Sociedade Americana de Diabetes
AGE	Compostos Avançados de Glicosilação
AKT	Proteína Cinase B
AUC	Área Sob a Cruva
DAG	Diacilglicerol
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
eNOS	Óxido Nítrico Sintetase endotelial
ERH	Elemento Responsível a Hipóxia
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EXO	Exossomos
FID	Federação Internacional de Diabetes
FOXO01	Fator "forkhead box" 01
G6PASE	Glicose-6 Fosfatase
G6PDH	Glicose 6 Fosfato Desidrogenase
GAP	Gliceraldeído 3 Fosfato
GAPDH	Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase
GFAT	Glutamina-frutose-6 fosfato amidotransferase
GLUT-4	Transportador de Glicose 4
GR	Glutathiona Redutase

GTP Guanosina Tri Fosfato

GWAS Estudos de Associação de amplitude de genoma

HIF-1 Fatores Induzidos por Hipóxia 1

hsa *Homo sapiens*

IKK Inibidor de Fator Nuclear Kappa B Cinase

IL Interleucinas

IRS Substrato do Receptor de Insulina

JNK Jun N terminal Cinase

KEGG Enciclopedia de Kyoto de Genes e Genomas

MAPK Fosfoquinase Ativada por Mitógeno

MCC Maximal Click Centrality

MCP-1 Proteína Quimioatrativa de Macrófagos

METS Síndrome Metabólica

miRNA microRNA

mTOR Alvo de Rapamicina em mamíferos

MV Micro Vesículas

MVB Corpo Multi Vesicular

NF-κB Fator Nuclear κ B

NK Natural Killer

OR Odds Ratio

PARP-1 Poli(ADP-ribosil)ato 1

PEPCK Fosfoenol Piruvato Carboxicinase

PI3K Fosfatidil Inositol 3 Cinase

PKC Proteína Cinase C

pre-miRNA miRNA Precursor

pri-miRNA miRNA Primário

PTP-1B Proteína-Tirosina Fosfatase 1B

RI Resistência Insulínica

RISC Complexo de Silenciamento Induzido por miRNA

ROC Características Operacionais do Receptor

SDH Sorbitol Desidrogenase

STAT-1 Tradutor de Sinal e Ativador de Transcrição 1

TNF Fator de Necrose Tumoral

VE Vesícula Extracelular

VEGF Fator de Crescimento Vascular Endotelial

LISTA DE URLS

Enrichr <https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>

Ensembl <https://www.ensembl.org/biomart/martview/>

GEOdataset <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>

miRBase <http://www.mirbase.org/>

miRPath <http://snf-515788.vm.oceanos.grnet.gr/>

miRWalk 3.0 <http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>

WebGestalt <http://www.webgestalt.org/>

SUMÁRIO

Dedicatória.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 DIABETES.....	13
1.3 SINALIZAÇÃO DE INSULINA	19
1.4 RESISTÊNCIA INSULÍNICA	21
1.5 PRÉ-DIABETES	22
1.6 microRNA.....	24
1.7 NOMENCLATURA DE miRNA.....	25
1.8 BIOGÊNESE DE miRNA.....	25
1.9 miRNA CIRCULANTES.....	27
1.10 miRNA COMO BIOMARCADORES.....	29
1.1 1miRNA E DIABETES.....	30
2. HIPÓTESE	31
3. JUSTIFICATIVA.....	31
4. OBJETIVO	32
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1 ANÁLISE DE DADOS EM REPOSITÓRIOS PÚBLICOS.....	33
5.2 IDENTIFICAÇÃO DE microRNA DE ALTA CONFIANÇA	34
5.3 ANÁLISE DOS GENES ALVOS.....	34
5.4 CONSTRUÇÃO DA REDE miRNA-mRNA.....	35
5.5 ANÁLISE DO ENRIQUECIMENTO DE VIAS.....	35
6. RESULTADOS.....	38
6.1 IDENTIFICAÇÃO DOS microRNA DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ...	38
6.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MRNA ALVOS E CRIAÇÃO DA REDE DE INTERAÇÃO miRNA-mRNA EM INDIVÍDUOS PRÉ-DIABÉTICOS	40
6.3 ANÁLISE DE CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DO RECEPTOR (ROC)	43
7. DISCUSSÃO	45
8. CONCLUSÃO	52
9. PERSPECTIVAS.....	54
10. REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES

Diabetes mellitus (DM) é a doença crônica não transmissível mais prevalente em todo mundo (Guay et al., 2011). Estima-se que 422 milhões de pessoas conviviam com diabetes DM no ano de 2014, tendo sua prevalência dobrada na população adulta desde o ano de 1980 até os dias atuais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Segundo a Federação Internacional de Diabetes (FID) é esperado que cerca de 552 milhões de pessoas sejam portadoras de DM por volta de 2030.

O DM representa um custo global anual de 827 bilhões de dólares, e segundo a FID o custo hospitalar com DM triplicou em apenas uma década (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). De acordo com levantamento realizado pela pesquisa Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel, 2016), no Brasil, o número de diagnósticos de DM cresceu 61,8% em 10 anos.

Existem dois tipos de DM: Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1), classificada como doença autoimune causada pela destruição das células β pancreáticas e, conseqüentemente, comprometimento na secreção de insulina; e Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), caracterizada, principalmente, por uma resistência periférica à insulina. O DM1 é uma condição que ocorre normalmente na infância ou adolescência e corresponde a menos de 10% dos casos de DM, enquanto que o DM2 é responsável por cerca de 90% dos casos em todo o mundo (BHATIA et al., 2015).

O DM é definido por uma hiperglicemia prolongada (GIRI et al., 2018) decorrente da produção insuficiente de insulina e/ou por comprometimento de sua ação tecidual (GIRI et al., 2018). Segundo De Fronzo e colaboradores (2009), essa hiperglicemia é causada e mantida por uma disfunção conjunta de 8 órgãos (pâncreas, tecido adiposo, tecido muscular, fígado, intestino, rins, cérebro e estômago), levando a oito anormalidades fisiológicas principais que contribuem para perda da homeostase da glicose, conhecida como “octeto ameaçador”. O diagnóstico de DM, segundo a Associação Americana de Diabetes, é dado quando são registrados glicemia de jejum

≥ 126 mg/dl, hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$ e teste de tolerância a glicose ≥ 200 . A história natural do DM2 parte de uma predisposição genética à resistência insulínica, seguida por uma hiperglicemia crônica que leva a falência as células beta-pancreáticas. Embora o fator genético seja essencial para o desenvolvimento da doença, os fatores ambientais, tais como inatividade física e obesidade, são os principais responsáveis pela enorme incidência da doença nos países ocidentais (DEFRONZO, 2009).

1.2 HIPERGLICEMIA

Quatro mecanismos orquestram os insultos decorridos do estado de hiperglicemia crônica: (i) ativação da via da PKC pelo segundo mensageiro diacilglicerol; (ii) aumento do fluxo de ativação da via da Hexosamina; (iii) aumento da formação de produtos avançados de glicose e (iv) aumento do fluxo da via dos polióis. Todos esses mecanismos conectam-se através do aumento do estresse oxidativo (DU et al., 2003; YAN, 2018).

Em circunstâncias normoglicêmicas, a combustão da glicose possui intuito de gerar ATP e produzir NADPH e ribose através da via das pentoses (YAN, 2018). A hiperglicemia desencadeia uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas mitocôndrias, através da superprodução de moléculas doadoras de elétrons como NADH e FADH² via glicólise e ciclo de Krebs, resultando em um desbalanço na razão ATP/ADP que modifica o potencial de membrana mitocondrial (GIRI et al., 2018; ROCHETTE et al., 2014). O alto gradiente de prótons diminui a diferença de potencial eletroquímico, reduzindo a capacidade de transporte de elétrons no complexo III da mitocôndria, causando o acúmulo de elétrons na coenzima Q10 (GIRI et al., 2018). Este alto gradiente de prótons é responsável por prolongar a vida de intermediários geradores de superóxidos como a ubisemiquinona (BROWNLEE et al., 2000).

O aumento da razão ATP/ADP diminui a atividade da via glicolítica levando a um acúmulo de glicose (GIRI et al., 2018). Esta por sua vez leva a ativação da via dos polióis que converte glicose à sorbitol através da enzima Aldose Redutase (AR) utilizando NADPH como cofator (MAAMOUN et al., 2019). Posteriormente o sorbitol é oxidado à frutose pela Sorbitol Desidrogenase (SDH) reduzindo NAD⁺ a NADH, diminuindo ainda mais a disponibilidade de NAD oxidado (MAAMOUN et al., 2019).

Em situações normoglicêmicas a via dos polióis acontece em uma quantidade desprezível, porém, ela chega a corresponder 30% do destino da glicose no DM (YAN, 2018). Isso intensifica o estresse oxidativo, pois o NADPH utilizado na primeira fase da via do poliol é essencial para o sistema da Glutathione Redutase (GR)/Glutathione peroxidase que regenera a glutathione oxidada para que exerça sua ação antioxidante (ROCHETTE et al., 2014). Em consequência disso, a via das pentoses, que é importante fonte de NADPH, tem sua atividade diminuída, pois o acúmulo de radicais livres inibe a atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), que é uma enzima limitante da via, reduzindo ainda mais a disponibilidade de NADPH e gerando um ciclo vicioso de aumento de estresse oxidativo (MAAMOUN et al., 2019).

O estresse oxidativo leva a danos no DNA da mitocôndria e em proteínas mitocondriais (MAIESE, 2015). Com isso temos a ativação de fatores de transcrição poli(ADP-ribosil)ato (PARP-1) como p53 e fos (DU et al., 2003). PARP-1 inibe Gliceraldeído-3-fosfato-dehidrogenase (GAPDH) levando ao acúmulo de gliceraldeído-3-fosfato (GAP) e dos metabólitos da glicólise acima desta enzima, ativando as vias da hexosamina e a já discutida via do poliol (DU et al., 2003). O acúmulo de GAP leva a produção de Diacilglicerol (DAG), que liga-se ao receptores de membrana ativando isoformas da proteína kinase C (PKC) (GIRI et al., 2018). PKC afeta, dentre outras vias, a endotelial óxido nítrico sintetase (eNOS), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e atividade do fator nuclear kappa B (NF- κ B) que estão relacionados com danos vasculares resultantes da hiperglicemia (figura 1) (MAAMOUN et al., 2019).

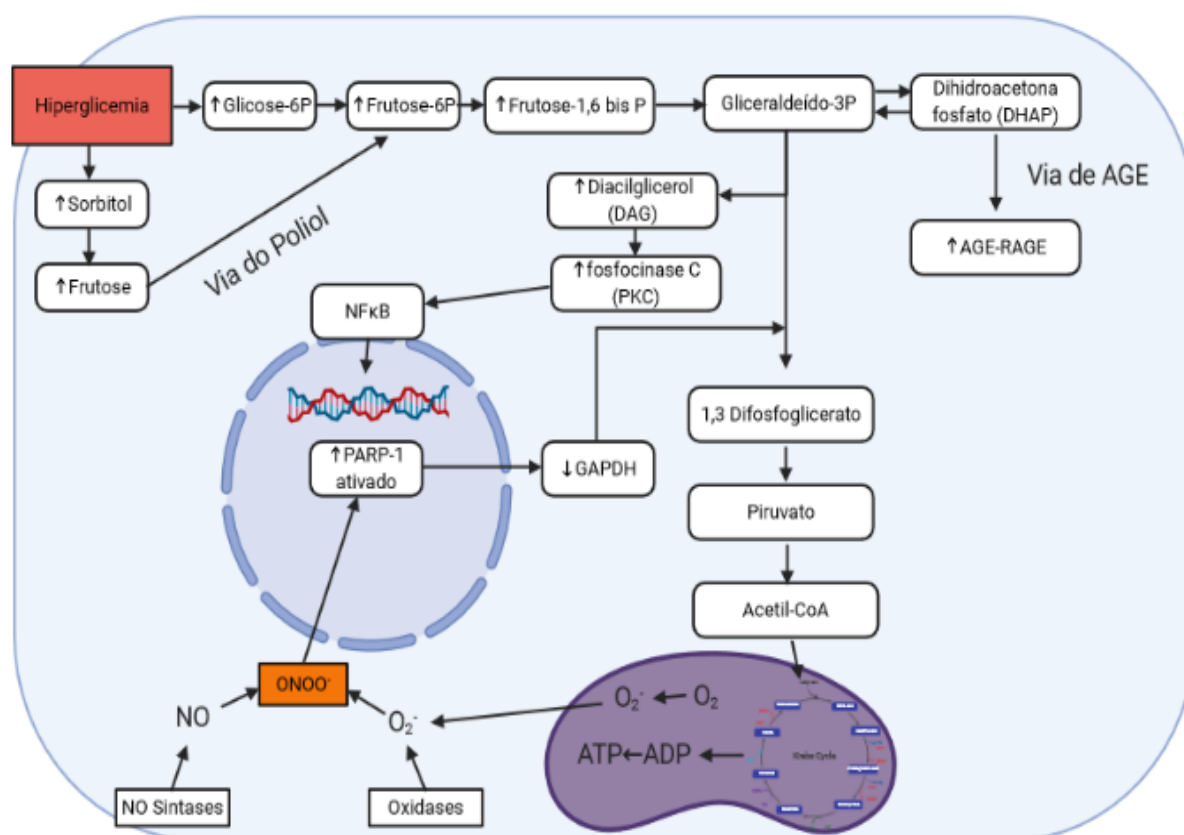


Figura 0-1 Mecanismos moleculares do DM2. A hiperglicemia leva a ativação exacerbada da via do sorbitol, através do acúmulo de ATP, reduzindo disponibilidade de NADPH e aumentando frutose-6P e espécies reativas de oxigênio. O acúmulo de ERRO gera danos no DNA ativando PARP-1 que reduz atividade da enzima GAPDH gerando aumento de DAG e GAP, ativando fatores nucleares como NFκB e a via das trioses, levando ao acúmulo de compostos avançados glicosilados. (adaptada de Rochette et al., 2014).

O acúmulo de GAP leva a ativação da via das trioses e, conseqüente, aumento da produção de um precursor de compostos avançados de glicosilação (AGE). Os AGE possuem papel pivotal nas complicações do diabetes (Pappachan et al., 2013). Além das modificações nas funções das proteínas, proteínas modificadas por AGE exercem efeitos celulares mediante sua interação com receptores específicos de AGE (RAGE), dando início a resposta inflamatória (ALLAMAN; BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2015). Evidências mostram que AGE levam a indução da autofagia e proliferação vascular de músculo liso que podem causar aterosclerose e, mais tardiamente, cardiomiopatia (MAIESE, 2015).

A terceira via que tem sua ativação aumentada pela inibição da GADPH, é a via das hexosaminas. Em condições normoglicêmicas, essa via representa menos de 5% do influxo da glicose (NIE; YI, 2019). Nesta via, a frutose-6p é convertida a glucosamina-6p através da ação da enzima glutamina-frutose-6p amidotransferase (GFAT), que é a primeira enzima limitante do processo (NIE; YI, 2019). As reações enzimáticas subsequentes levam a formação de Uridina-difosfato N-acetilglucosamina (UDPGlcNAc) (TEO; WOLLASTON-HAYDEN; WELLS, 2010). A O-linked N-acetilglucosamina transferase (OGT) e OGlcNAcase (OGA) são responsáveis pela adição e remoção, respectivamente, do UDPGlcNAc (NIE; YI, 2019). OGT catalisa a O-GlcNAcilação nos resíduos de serina e treonina de proteínas, e foi reportado que níveis excessivos de O-GlcNAcilação estão associados a glicotoxicidade decorrente do DM (figura 2) (GIRI et al., 2018; NIE; YI, 2019; TEO; WOLLASTON-HAYDEN; WELLS, 2010).

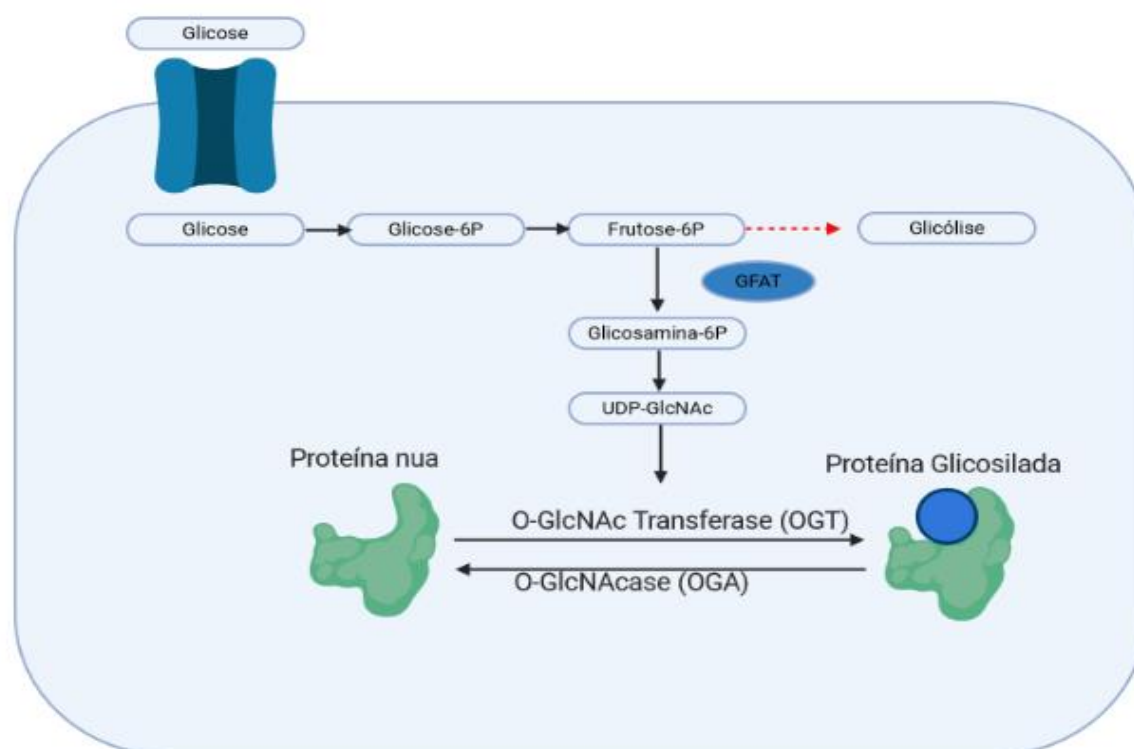


Figura 0-2: Mecanismo glicotoxicidade decorrido do aumento do influxo da via das Hexosaminas. O aumento da atividade da GFAT leva ao aumento da OGT aumento a quantidade de proteínas glicosiladas (Adaptada de Nie & Yi, 2019).

A presença de ERO em altas quantidades impacta também na longevidade e sobrevivência celular induzindo apoptose e autofagia (MAIESE, 2015). Morte celular por apoptose ocorre no DM nas células β -pancreáticas, cardiomiócitos, células endoteliais, células renais e neurônios (MAIESE, 2015). Os lipídios presentes na membrana celular são altamente susceptíveis ao estresse oxidativo. O ataque das espécies reativas de oxigênio à membrana celular gera peroxidação lipídica, que compromete a estrutura e função dos sistemas alvos gerando morte celular. Em decorrência da morte celular há a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiotáticas que promovem o recrutamento de neutrófilos e macrófagos ao endotélio e tecido adiposo (ROCHETTE et al., 2014).

O tecido adiposo é composto por diversas células como: adipócitos e pre-adipócitos, células mesenquimais e células imunes (FANG; PYNE; PYNE, 2019). O tecido adiposo é responsável pela liberação de diversas citocinas envolvidas no processo de inflamação. Isso inclui Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interleucinas 1 (IL1), 6 (IL6) e 10 (IL10), Leptina, Adiponectina, Resistina, Proteína Quimioatrativa de Macrófago (MCP-1), dentre outras (LONTCHI-YIMAGOU et al., 2013). Durante uma contínua exposição a balanço energético positivo, há uma hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo levando ao aumento de secreção de adipocinas (ROCHETTE et al., 2014). O aumento do número de citocinas pró-inflamatórias somados a maior recrutamento de macrófagos, células T e células *natural killer* (NK), promove uma inflamação crônica de baixo grau e resistência insulínica (FANG; PYNE; PYNE, 2019).

O excesso de tecido adiposo promove também a circulação de diferentes tipos de lipídeos no sangue, como por exemplo triacilglicerol, ácidos graxos não esterificados e ceramida (FANG; PYNE; PYNE, 2019). O fornecimento excessivo de lipídeos ativa a Proteína cinase C (PKC), induzindo a atividade de fosforilação do receptor de insulina (IR, do inglês *insulin receptor*) e do Substrato de Receptor de Insulina (IRS, do inglês *insulin recepto substrate*) dependente de Inibidor de fator nuclear Kappa-B cinase (IKK) e c-Jun N-terminal Cinase (JNK) estimulando os fatores pró-inflamatórios como Tradutor de Sinal e Ativador de Transcrição 1 (STAT-1) e Fator Nuclear Kappa de células B ativadas (NFkB), levando à apoptose (FANG; PYNE; PYNE, 2019).

Toda essa perturbação sistêmica ocasionada pelo DM resulta na liberação de moléculas que podem ser utilizadas como biomarcadores, contribuindo para o diagnóstico precoce da doença (KRHAČ; LOVRENČIĆ, 2019). Isso se faz importante, uma vez que os métodos de diagnósticos convencionais falham em prever o aparecimento da doença nos estágios iniciais ou o estado pré-diabético (KRHAČ; LOVRENČIĆ, 2019), e como consequência, as estimativas apontam que o número de pacientes não diagnosticados representem 30% dos portadores de DM (ZHANG et al., 2015). Por conta da demora de diagnóstico, o DM possui a maior pontuação de invalidez dentre as doenças crônicas devido a glico e lipotoxicidade (TWIGG; WONG, 2015).

1.3 SECREÇÃO e SINALIZAÇÃO DE INSULINA

A secreção da insulina pelas células β ocorre de duas maneiras. A glicose entra nas células β através do transportador de glicose 1 (GLUT1) não dependente de insulina, aumentando a relação ATP/ADP que fecha os canais de potássio sensíveis ao ATP e leva a despolarização pela abertura dos canais de cálcio de sódio voltagem-dependentes. O aumento do influxo de cálcio leva a exocitose dos grânulos de insulina, caracterizando a primeira fase da secreção de insulina que leva 5-10 minutos após a sinalização da glicose. (KALWAT; COBB, 2017). A segunda fase da secreção requer o recrutamento de grânulos de insulina localizados em reservatórios intracelulares, sendo necessária a reorganização dos filamentos de actina do citoesqueleto (KALWAT; THURMOND, 2013). O primeiro passo é descrito como via de gatilho da insulina, enquanto o segundo é descrito como via amplificadora da insulina (figura 3). Ambos os mecanismos estão diminuídos no DM2 (KALWAT; COBB, 2017).

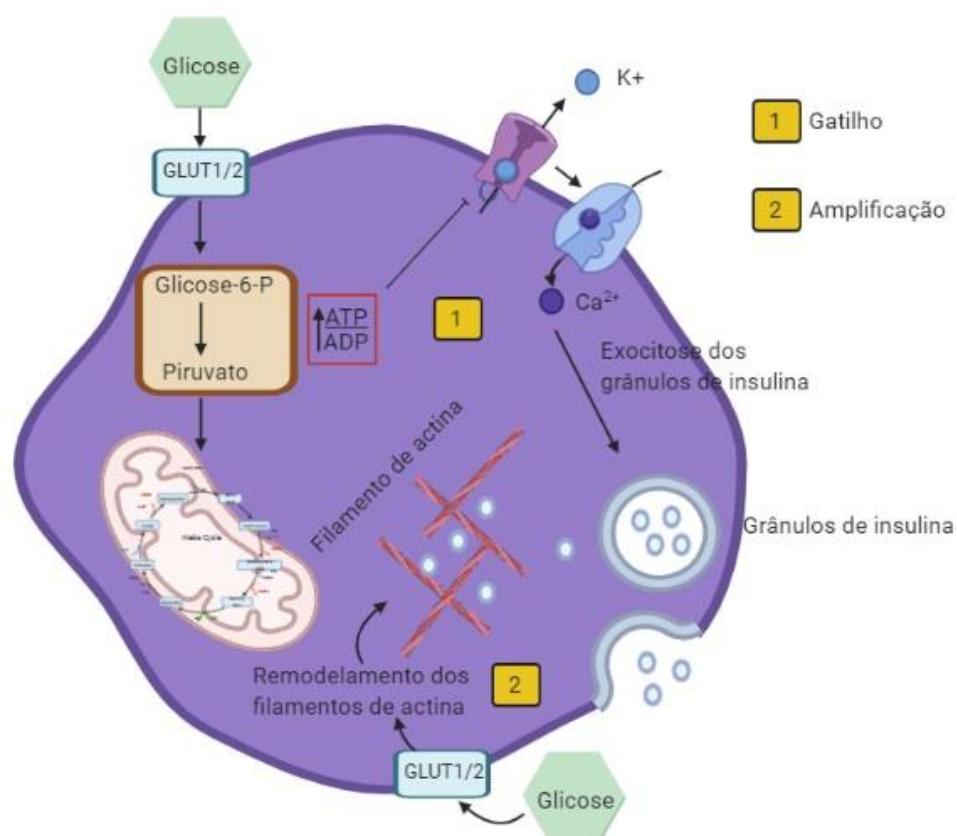


Figura 0-3: Mecanismos de secreção de insulina. A primeira fase consiste da abertura de canais de cálcio e exocitose dos grânulos através da proteína de ligação de elemento responsável ao cálcio. A segunda fase consiste na amplificação com recrutamento dos grânulos disponíveis em reservatórios intracelulares, através do remodelamento dos filamentos de actina.

A insulina é também um importante fator de crescimento e suas atividades mitogênicas são exercidas através da ativação das vias da MAPK/Ras. A MAPK é ligada ao IRS através das proteínas adaptadoras Grb2 e *Shc*, sendo responsável pela geração de fatores de transcrição, crescimento, diferenciação e proliferação celular (ABDUL-GHANI; DEFRONZO, 2010). A sinalização da insulina é regulada pela endocitose dos receptores, desfosforilação dos resíduos de tirosina e por fosforilação em serina das subunidades beta do receptor por serinas cinases, como a PKC (GUTIÉRREZ-RODELO; ROURA-GUIBERNA; ALBERTO OLIVARES-REYES, 2017).

A fosforilação do IRS-1 leva à associação com a subunidade de 85kDa da fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3K) causando sua ativação (ABDUL-GHANI; DEFRONZO, 2010), a ativação da PI3K leva a fosforilação da proteína cinase B ou AKT, que possui um papel central na sinalização da insulina, estando envolvido com

a translocação do transportador de glicose dependente de insulina (GLUT4) para a membrana celular (Figura 4), adipogênese, síntese de glicogênio e proteínas (GUTIÉRREZ-RODELO; ROURA-GUIBERNA; ALBERTO OLIVARES-REYES, 2017).

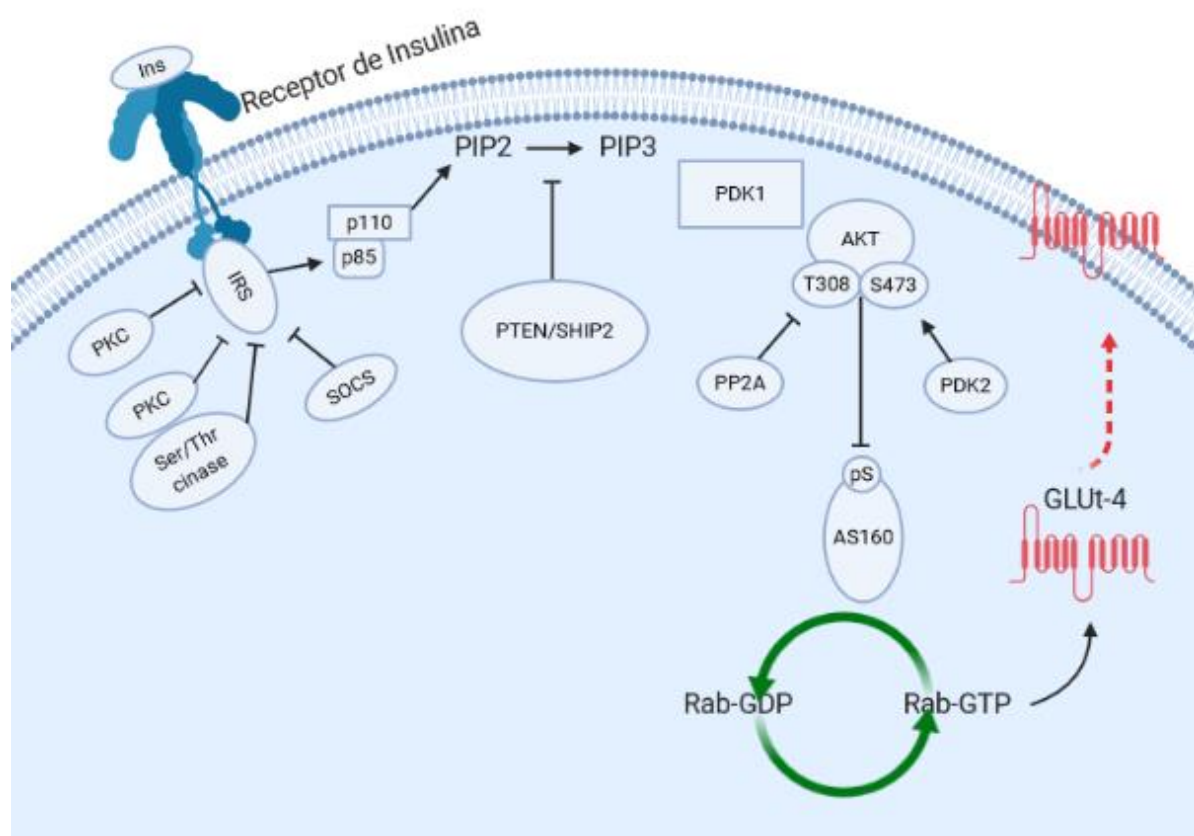


Figura 0-4: Sinalização intracelular da insulina após ligar-se ao seu receptor. A ação da insulina envolve a fosforilação em resíduos de tirosina do seu receptor que dão início a uma cascata de fosforilações ativando AKT que irá promover a translocação do GLUT-4 para a membrana celular (adaptada de Gutierrez-Rodelo et a., 2015).

1.4 RESISTÊNCIA INSULÍNICA

A resistência insulínica (RI) é a principal característica da DM2, estando diretamente associada à hiperglicemia e à hiperinsulinemia. A RI é definida pela incapacidade da célula em responder adequadamente aos estímulos gerados pela interação da insulina ao seu receptor (ABDUL-GHANI; DEFRONZO, 2010). Diversos mecanismos influenciam na redução da sinalização intracelular ativada pela insulina, incluindo mutações e modificações pós-translacionais dos receptores de insulina ou

de seus alvos a jusante da cascata de sinalização. (GUTIÉRREZ-RODELO; ROURA-GUIBERNA; ALBERTO OLIVARES-REYES, 2017).

Em geral a RI envolve a diminuição da quantidade e/ou eficiência dos receptores de insulina. Os receptores de insulina pertencem a uma família de receptores de tirosina cinase (GUTIÉRREZ-RODELO; ROURA-GUIBERNA; ALBERTO OLIVARES-REYES, 2017) e são receptores tetraméricos com duas subunidades alfa e duas beta (SALTIEL; KAHN, 2012). A insulina liga-se as subunidades alfas, localizadas na parte externa da membrana celular, gerando mudanças conformacionais das subunidades beta, localizadas no citosol e, conseqüente, autofosforilação em diversos resíduos de tirosina que serão reconhecidos, posteriormente, pelos substratos do receptor de insulina (IRS-1/2) (GUTIÉRREZ-RODELO; ROURA-GUIBERNA; ALBERTO OLIVARES-REYES, 2017; SALTIEL; KAHN, 2012).

A principal causa da resistência insulínica é decorrente da fosforilação no resíduo serina tanto do receptor de insulina quanto do seu substrato, bem como do aumento da atividade de fosfatase de tirosinas, envolvendo PTP-1B que diminui a atividade de PI3K e AKT, causando deficiência na translocação do GLUT-4 para membrana (GUTIÉRREZ-RODELO; ROURA-GUIBERNA; ALBERTO OLIVARES-REYES, 2017; SALTIEL; KAHN, 2012). O aumento de ácidos graxos livres e metabólitos como Diacilglicerol (DAG), acylCoA e ceramidas, assim como citocinas inflamatórias, geram ativação de isoformas de PKC que fosforilam o IRS em resíduos serina/treonina causando RI (ABDUL-GHANI; DEFRONZO, 2010; GUTIÉRREZ-RODELO; ROURA-GUIBERNA; ALBERTO OLIVARES-REYES, 2017; SALTIEL; KAHN, 2012).

1.5 PRÉ-DIABETES

O pré-diabetes é definido como o período que antecede o início do diabetes tipo II, durante o qual o nível plasmático de glicose está acima do normal, porém menor que o detectado em indivíduos com DM. Atualmente, sabe-se que a disfunção das células β pancreáticas e a resistência à insulina estão relacionadas ao estado de pré-diabetes e, conseqüentemente, ao DM (TABÁK; HERDER; KIVIMÄKI, 2017). Contudo, a resistência insulínica periférica pode preceder em muito tempo a disfunção

pancreática nestes indivíduos (DEFRONZO; TRIPATHY, 2009) e, até mesmo, preceder os estados pré-diabéticos e diabéticos (TABÁK; HERDER; KIVIMÄKI, 2017). Evidências apontam que a destruição das células beta pancreáticas começa antes do desenvolvimento do DM2 e que no momento em que os parâmetros bioquímicos atingem os limites para diagnóstico da doença, os pacientes já perderam 50% do volume das células beta (BUTLER et al., 2003). As alterações no teste de tolerância à glicose e da glicemia em jejum refletem a resistência à insulina e a diminuição da função das células β -pancreáticas (KANAT; DEFRONZO; ABDUL-GHANI, 2015). A elevação permanente da resistência à insulina junto à diminuição da função das células β culminam com desregulação da taxa de glicemia, levando ao estado de hiperglicemia que marca a transição para o estado de diabetes. Daí a necessidade de intervenção no estado pré-diabetes.

Por muito tempo considerou-se o pré-diabetes um estado latente ou até mesmo inócuo. Estudos apontam o comprometimento da função de diversos órgãos nesta fase. As disfunções associados ao estado do pré-diabetes incluem alterações microvascular (neuropatia, nefropatia e retinopatia), macrovascular (doença coronariana, acidente vascular cerebral), disfunção cognitiva, flutuações abruptas de pressão arterial, apneia obstrutiva do sono, doença gordurosa hepática e câncer (BUYSSCHAERT et al., 2015; GARBER et al., 2008; TABÁK; HERDER; KIVIMÄKI, 2017).

O diagnóstico do estado de pré-diabetes se dá pela glicemia em jejum, teste de tolerância à glicose e hemoglobina glicada, mas apesar destes parâmetros estarem bem definidos para a detecção deste estado um percentual significativo destes indivíduos evolui para o DM. Estima-se que a incidência de pré-diabetes seja em torno de 30%. Apenas nos Estado Unidos, existem 84 milhões de pré-diabéticos, representando 1/3 da população adulta, sendo que 90% destes não sabem que são pré-diabéticos (NCCDPHP, 2019). Ghai e colaboradores (2019), verificaram que 50% dos pacientes pré-diabéticos evoluíram para DM2 em até 5 anos, e outros estudos defendem que essa evolução pode chegar a 70% dos pacientes pré-diabéticos (WILSON, 2017).

A relevância da identificação precoce de indivíduos pré-diabéticos é sustentada pelo fato de que alterações fisiopatológicas estão presentes antes que os valores

glicêmicos atinjam níveis supranormais, agravando-se com a progressão da doença. Portanto, o pré-diabetes pode ser considerado um ponto chave crítico visto que é uma fase reversível e, conseqüentemente, uma estratégia para evitar o diabetes. Outro elemento que aponta a relevância do estado pré-diabético é o impacto econômico devido ao custo anual com tratamento apresentar um crescimento exponencial quando se compara indivíduos pre-diabéticos e diabéticos, sendo decorrente do agravamento das comorbidades (WILSON, 2017).

Estudos prévios já demonstraram que intervir nos pacientes em estágio do pré-diabetes logrou êxito significativo na prevenção do DM. A principal conduta para impedir que o pré-diabetes evolua para o DM2 é a intervenção no estilo de vida. Contudo, uma vez que o estado do pré-diabetes é um estado dinâmico, o desenvolvimento de novos métodos para detectar este estado com precisão e precocemente a fim de ter um número menor de comorbidades é de extrema relevância. Evitar o avanço do diabetes é prioridade, visto que este é quinta principal causa de morte no mundo, representando 1,6 milhão de mortes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Além do agravante de que os pacientes diabéticos têm um risco aumentado de 15% de morte prematura e de redução de expectativa de vida (TANCREDI et al., 2015).

Neste cenário, destacam-se os estudos cujo foco tem sido regulação pós-transcricional de genes, destacando-se os microRNA. Desde sua descoberta em 1993, as pesquisas com microRNA (miRNA) tem se intensificado exponencialmente nas áreas de fisiopatologia na busca de marcadores biológicos para diagnóstico e prognóstico de doenças (biomarcadores), bem como no desenvolvimento de novos fármacos devido a sua capacidade de regular diversos processos biológicos (BHATIA et al., 2015).

1.6 microRNA

Os miRNA são pequenos RNA que não codificam proteínas e estão envolvidos em modulações pós-transcricionas de genes (HA; KIM, 2014). São extremamente

conservados evolutivamente e atuam em situações fisiológicas no ajuste fino da transcrição dos genes. Sua sequência madura ou funcional possui entre 18 a 24 nucleotídeos que se ligam a regiões do mRNA por complementariedade de bases para silenciá-lo. São expressos ubiquamente, porém diversos miRNA possuem especificidade tecidual (MOHR; MOTT, 2015). Os miRNA identificados por análises de predição ou experimentalmente são depositados no banco de dados de microRNA denominado miRNAbase, atualmente, na versão 22.1 com mais de 2500 miRNA maduros anotados e mais de 4000 termos de GO associados (HUNTLEY et al., 2018).

1.7 NOMENCLATURA DE miRNA

Os primeiros miRNA descobertos foram nomeados através do seu fenótipo (Ex: Let e Lin), porém há medida que mais miRNA foram descobertos, estabeleceu-se uma regra de denominação dos mesmos. A sigla miR refere-se ao microRNA maduro, enquanto mir refere ao gene que codifica o pri-miRNA predito. O número é referente à ordem de descoberta de cada microRNA. Os miRNA semelhantes que apresentam diferenças em apenas 1 ou 2 nucleotídeos são nomeados pelo mesmo número e recebem um sufixo alfabético (ex: miR-19a, miR-19b) enquanto miRNA idênticos que são gerados a partir de pre-miRNA que diferem em algumas bases ou gene loci diferente recebem um algarismo (ex: miR-24-1 e miR-24-2). As três primeiras letras são referentes ao organismo de origem daquele miRNA (ex: hsa pra *Homo sapiens*, mmu para *Mus musculus*...). Quando dois miRNA são identificados do mesmo precursor, utiliza-se um asterisco para identificar a fita de miRNA oposta ao precursor. Caso ainda não existam dados suficientes para determinar os predominantes, estes são identificados pela indicação da fita de origem do miRNA maduro (3p ou 5p), a exemplo: hsa-miR-106b-5p (GRIFFITHS-JONES, 2006).

1.8 BIOGÊNESE DE miRNA

Os genes que codificam miRNA são transcritos pela RNA polimerase II e III no núcleo celular na forma de transcritos primário com cerca de 100-1000 nucleotídeos denominados de miRNA primário (pri-miRNA) (POGRIBNY, 2018). Estes pri-miRNA

possuem formato de grampo devido a regiões complementares que se auto pareiam e regiões não complementares que formam a alça do grampo. (BHASKARAN; MOHAN, 2014). Os pri-miRNA são então clivados por um complexo proteico conhecido como microprocessador, que contém duas proteínas conhecidas, a Drosha e DGCR8 ou também conhecida como Pasha (BHASKARAN; MOHAN, 2014). Drosha e Pasha clivam as regiões de fita simples de RNA do pri-miRNA formando o miRNA precursor ou pré-miRNA (HA; KIM, 2014). O pré-miRNA é então exportado ao citoplasma através da proteína Exportin 5, onde então será reconhecido e novamente clivado pela proteína Dicer, dessa vez gerando dois miRNA de fita simples, miRNA-5p e miRNA-3p conforme representado na figura 5 (AMARAL et al., 2010). Na grande maioria dos casos, a fita 5p, também conhecida como guia, entra para um complexo proteico de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde liga-se a proteína argonauta para formar paridade com os mRNA que levará a destruição ou inibição do RNA mensageiro (HA; KIM, 2014), no entanto, o silenciamento do gene através do complexo RISC pode ser guiado, em alguns casos, pela fita 3p do miRNA (BHASKARAN; MOHAN, 2014).

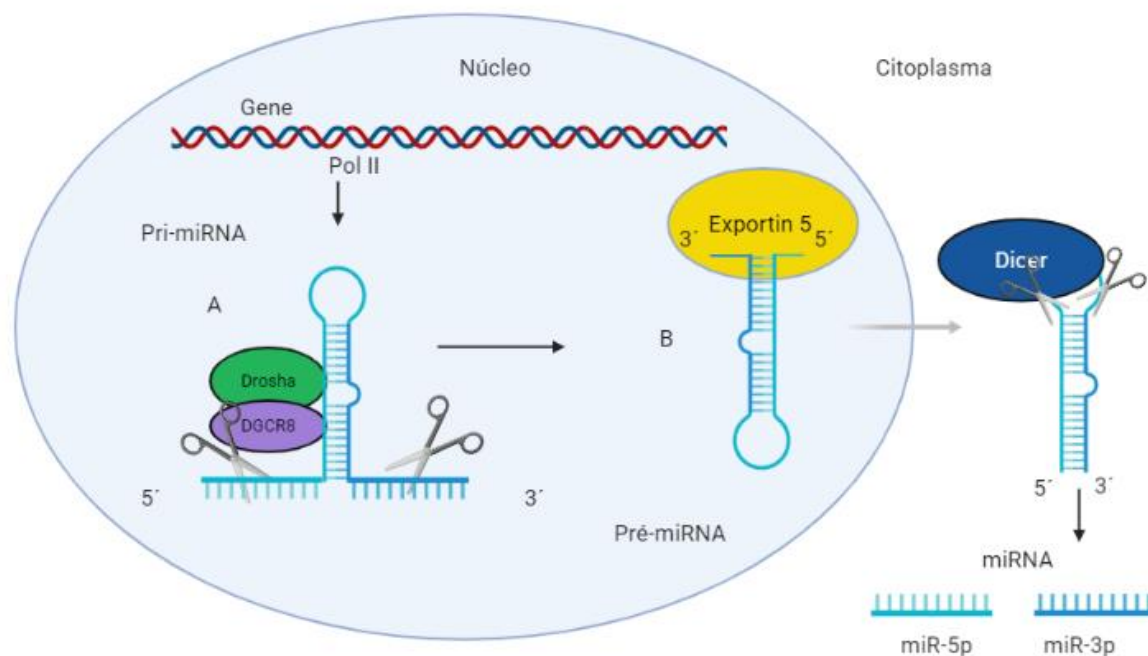


Figura 0-5: Biogênese de miRNA. O Pri-miRNA é transcrito através de região intrônica de gene ou gene próprio. O complexo Drosha/DGCR8 cliva as extremidades 5' e 3' não pareadas formando o Pré-miRNA. Pré-miRNA é exportado para o citoplasma para o complexo enzimático contendo a Dicer, que retira a região da alça do miRNA formando dois miRNA de fita simples. O guia e o passageiro.

1.9 miRNA CIRCULANTES

Dados mais recentes sugerem que além da capacidade de regulação na sua célula mãe, os miRNA também podem ter um efeito parácrino, atuando na comunicação célula-célula, regulando a tradução do mRNA em condições fisiológicas e patológicas. (BJØRGE et al., 2018; ETHERIDGE et al., 2011; MAKAROVA et al., 2016; PARDO et al., 2018). Os miRNA estão presentes em todos os fluidos corporais, como sangue e saliva (ETHERIDGE et al., 2011; TURCHINOVICH; TONEVITSKY; BURWINKEL, 2016), no entanto, devido à sua alta instabilidade e altas concentrações de RNase no plasma, o miRNA não pode fluir livremente através do sangue (ETHERIDGE et al., 2011; SCREEN et al., 2014; TURCHINOVICH; TONEVITSKY; BURWINKEL, 2016; YOON, Yae Jin; KIM; GHO, 2014). Com base nessas informações, foi então assumido que a estabilidade desses miRNA extracelulares (ex-miRNA) era concedida por ligação a uma proteína ou por armazenamento em

vesículas extracelulares (VE) (DEVHARE; RAY, 2018; ETHERIDGE et al., 2011; TURCHINOVICH; TONEVITSKY; BURWINKEL, 2016).

As VE, inicialmente consideradas como estruturas que continham resíduos do catabolismo celular ou elementos potencialmente tóxicos para célula, são descritas atualmente como estruturas de grande relevância como mediadoras da comunicação intercelular (FABBRI, 2017). Desta forma, as VE participam como moduladoras de diversos processos biológicos através da transferência célula à célula de diferentes elementos tais como proteínas de membrana, moléculas de sinalização, mRNAs e miRNAs (BANG; THUM, 2012; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Os mecanismos que regem a interação das VE com a célula alvo ainda não estão bem elucidados. São propostos mecanismos de endocitose mediada por receptor na célula alvo ou macropinocitose (FITZNER et al., 2011; MORELLI et al., 2004). Esta interação célula à célula é importante em diversas condições fisiológicas como reparo tecidual, manutenção de células-tronco e coagulação sanguínea (EL ANDALOUSSI et al., 2013; YUANA; STURK; NIEUWLAND, 2013), mas também em condições patológicas como no câncer (HESSVIK; SANDVIG; LLORENTE, 2013). As VE são originadas do processo de invaginação da membrana celular e contém proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (CHOI et al., 2013). Diferentes tipos de classificação baseadas em parâmetros distintos como tamanho da vesícula, biogênese e função biológica são propostas para distinguir as VE, sendo mais comumente aceita a classificação em quatro principais categorias: microvesículas, exossomos corpos apoptóticos e oncosomas (EL ANDALOUSSI et al., 2013; FABBRI, 2018; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). As microvesículas (MV) originam-se da membrana plasmática por brotamento externo e fissão. São vesículas de tamanho entre 50 e 1000nm e, semelhante à célula de origem, expressam integrinas, selectinas e CD40 (DEVHARE; RAY, 2018; EL ANDALOUSSI et al., 2013; MURALIDHARAN-CHARI et al., 2010). Os exossomos (EXO), vesículas entre 40 e 100nm (CHEVILLET et al., 2014), são formados por endocitose da membrana plasmática, constituindo endossomos que são capturados pelos corpos multivesiculares (BJØRGE et al., 2018). Esses corpos multivesiculares são conhecidos como centros de carregamento e reciclagem de miRNA e são responsáveis pela exportação dos miRNA (ETHERIDGE et al, 2011). O mecanismo de liberação dos EXO também ainda é pouco

entendido. Aparentemente maquinarias diferentes são utilizadas a depender do tipo celular (HATHAWAY et al., 2017), apesar de que algumas evidências sugerem que ceramidas podem estar envolvidas no processo, uma vez que o uso de esfingomielinase 2 atenuou a exportação de EXO (KOSAKA et al., 2010). Proteínas RAB GTPase também parecem ter função na exportação de EXO (BOBRIE et al., 2011), e a fusão dos MVB com a membrana celular parece ocorrer via Receptores de Proteínas de Fator de Adesão N_Etilmalemida-sensível (do inglês: SNARE) (BJØRGE et al., 2018).

Embora pouco ainda se saiba sobre formação e função dos exossomos, diversos estudos têm reconhecido a importância dos miRNA circulantes na regulação de doenças como o DM2 (GE et al., 2019; KAMALDEN et al., 2017; NAGAISHI et al., 2016; REZAIE et al., 2018; SANTOVITO et al., 2014).

1.10 miRNA COMO BIOMARCADORES

Os miRNA são imprescindíveis para a vida. Estudos em camundongos revelaram que a inibição da expressão de miRNA através do *knockout* da Dicer impossibilita o desenvolvimento embrionário levando à letalidade precoce (BERNSTEIN et al., 2003). Diversos outros estudos demonstraram a importância da regulação fisiológica dos miRNA na proliferação e no crescimento celular, bem como, na manutenção da homeostase do organismo. Portanto, surge a hipótese de que os miRNA poderiam estar envolvidos na patogênese de diversas doenças, como o câncer e as doenças metabólicas (POGRIBNY, 2018).

Notoriamente, os estudos com câncer demonstraram alterações no perfil de miRNA dos pacientes, trazendo à tona a possibilidade de identificação de assinaturas de expressão de miRNA que servem como biomarcadores para diversas patologias (POGRIBNY, 2018; SETHUPATHY, 2016). Apesar de muitos miRNA possuírem especificidade tecidual, é sabido que esses miRNA possuem a capacidade de circular pelo corpo como uma forma de comunicação intertecidual (SHAH; PATEL; FREEDMAN, 2018). Atualmente, diversos grupos investigam alterações na expressão de miRNA em inúmeras patologias, incluindo o DM (BHASKARAN; MOHAN, 2014; KONG et al., 2011).

1.11 miRNA E DIABETES

Desde o início do GWAS (*Genome-Wide Association Studies*), foi identificada em aproximadamente 70 diferentes loci associação com o surgimento ou desenvolvimento do DM (KATO, 2013). As influências genéticas, somada aos fatores ambientais e marcadores bioquímicos (Glicemia de jejum, HbA1c e teste de tolerância a glicose) conferem uma probabilidade de 85-90% de prever o surgimento do DM2 (BHATIA et al., 2015). No entanto, o impacto geral de genes ou loci variantes individualmente é geralmente modesto e conferem um *Odds Ratio* (OR) de aproximadamente 1,06 – 1,20 (KATO, 2013). Isso nos leva a crer que o DM2 é uma doença poligênica bastante heterogênea, e que as variantes genéticas diferem entre populações e estadiamento da doença (KATO, 2013).

Diversos perfis de miRNA foram identificados no DM (BHATIA et al., 2015; HE et al., 2017). Assim como as variantes, os resultados diferem entre etnias, estadiamento da doença e, adicionalmente, tecido analisado (HE et al., 2017). Em uma revisão sistemática sobre o tema, He e colaboradores (2017) encontraram 158 miRNA desregulados, associados ao DM2, vindo de 7 diferentes tipos de amostras. Diversos processos biológicos e vias de sinalizações eram reguladas pela atividade desses miRNA, segundo as análises de enriquecimento de genes e, possivelmente, as alterações nas vias de sinalização da insulina são as chaves para o mal funcionamento do metabolismo de carboidratos e lipídios.

Alguns estudos focaram em identificar os perfis de miRNA associados ao surgimento do DM2 em indivíduos susceptíveis (pré-diabéticos), na tentativa de encontrar um grupo de miRNA capaz de prever o DM2 (GHAI et al., 2019; JIMÉNEZ-LUCENA et al., 2018; LA SALA et al., 2019; MATSHA et al., 2018). Os resultados também diferiram em quais miRNA estavam induzidos ou inibidos nos pacientes pré-diabéticos, porém os miRNA-28-3p, miRNA-142, miRNA-486, miRNA-122, miRNA-15a, miRNA-320a, miRNA-126, e miRNA-375 aparecem alterados, de forma isolada, entre diversos estudos (VASU et al., 2019). Prever quais miRNA estão associados a progressão do pré-diabetes para o DM2 é desafiador, uma vez que nem todo paciente pré-diabético desenvolve a doença (GHAI et al., 2019) e poucos estudos foram desenvolvidos com este intuito (HE et al., 2017).

Em suma, diferentes perfis de miRNA estão sendo identificados por diversos grupos de pesquisa avaliando a mesma doença. Essas variações podem ocorrer por diferenças populacionais, como visto anteriormente, mas também deve-se levar em conta as diferenças em técnicas de avaliação de miRNA, nos kits comercialmente disponíveis, nos diferentes estágios da doença, no tamanho da amostra e até mesmo sexo dos indivíduos (VASU et al., 2019). Portanto, mais estudos metodologicamente semelhantes e avaliando as mesmas populações devem ser conduzidos no intuito de estabelecer perfis consistentes de miRNA para os diferentes casos. A identificação dos diferentes perfis de miRNA auxiliam na elucidação dos mecanismos patológicos do DM e promovem a capacidade de delineamento de medicamentos mais específicos (HUANG, 2017). Esses estudos irão auxiliar na identificação de biomarcadores de diagnóstico e alvos terapêuticos que irão reduzir a incidência de DM2 na população geral.

2. HIPÓTESE

Os miRNA representam uma potencial ferramenta para identificar indivíduos pré-diabéticos de forma precisa, permitindo a intervenção precoce para prevenir o desenvolvimento do DM2.

3. JUSTIFICATIVA

. O pré-diabetes acomete cerca de 30% da população adulta no mundo podendo chegar a 1/3 da população em países desenvolvidos. Estima-se que 70% dos portadores de pré-diabetes não estão cientes da sua condição. O estágio de pré-diabetes aumenta o risco de doenças cardiovasculares e já é responsável pelo acometimento de retinopatia, neuropatia e nefropatia antes da evolução para o DM2. Portanto, é necessário definir um método de diagnóstico preciso e precoce da fase do pré-diabetes. Uma alternativa promissora é através do uso de miRNA com biomarcadores. Os miRNA podem regular cerca de 60% do genoma humano e cada miRNA pode regular até 400 genes, acarretando em que sua expressão está diretamente associada a homeostase do organismo, bem como, ao desenvolvimento de doenças. Portanto, conhecendo as lacunas que ainda existem na identificação precoce do indivíduo pré-diabético, o uso deste biomarcador surge como uma

alternativa eficaz para reduzir o aumento vertiginoso do DM e a alta morbimortalidade.

4. OBJETIVO

- ▶ Estudar o perfil de expressão dos miRNA no pré-diabetes e sua correlação com as vias intracelulares associadas ao estado pré-diabético.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Identificar o perfil de expressão de microRNA em conjunto de dados públicos de pacientes pré-diabéticos e com DM2.
- ▶ Identificar genes-alvos de microRNA implicados nas vias de sinalização intracelulares do pré-DM2.
- ▶ Correlacionar os microRNAs e seus alvos e entender a interferências dos mesmos no pré-diabetes.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANÁLISE DE DADOS EM REPOSITÓRIOS PÚBLICOS

As análises de microRNA foram obtidas do repositório público do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/geodatasets/), Gene Expression Omnibus (GEO). Os termos de busca utilizados na pesquisa foram humanos, diabetes mellitus tipo 2, pré-diabetes, sangue. Dados de outras espécies não foram incluídos, já que o objetivo era encontrar biomarcadores da doença. Considerando o caráter sistêmico do diabetes, optamos por não incluir conjunto de dados cujo transcriptoma fosse oriundo apenas de biópsia de tecido. Apenas um conjunto de dados (GSE21321) atendeu aos critérios definidos para este estudo. O conjunto de dados GSE21321 consta de dois conjuntos de transcritos: GPL6883 e GPL10322.

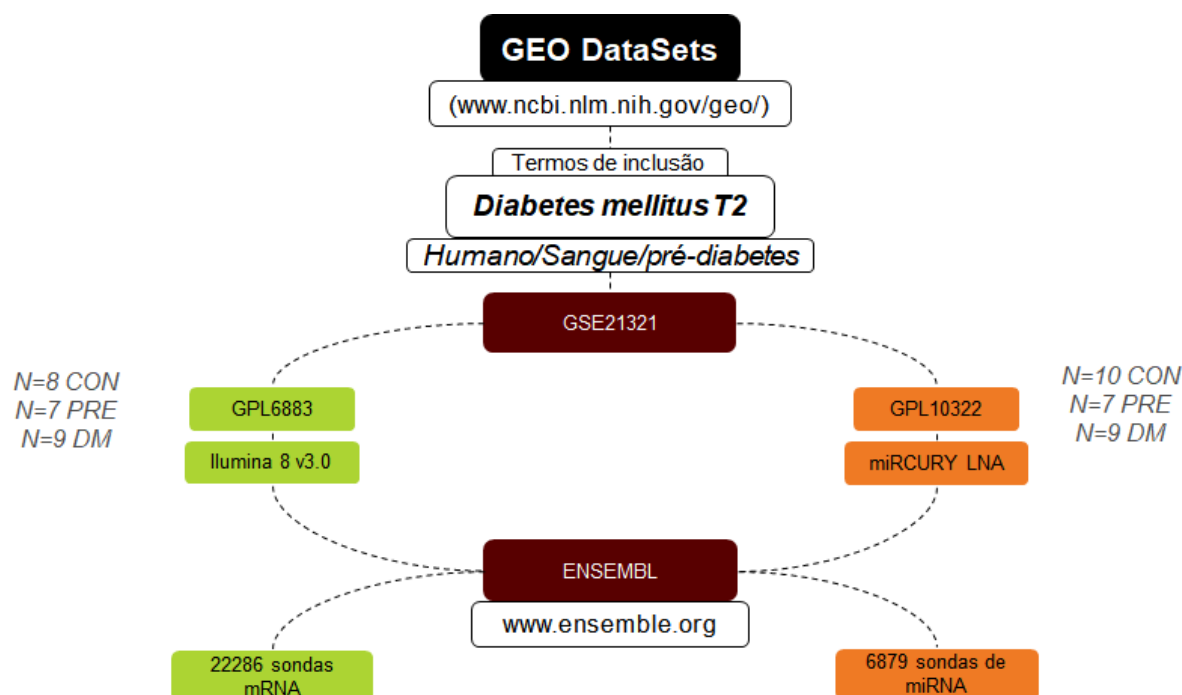


Figura 5-1: Fluxograma de seleção do transcriptoma.

GPL6883 trata 24527 sondas de pacientes divididos em 3 grupos: controle (CON) com n=8, Pré-diabético (PRE) com n=7 e diabético (DM) com n=9. As sondas foram analisadas pela ferramenta genômica Ensembl/BioMart (www.ensembl.org/biomart/), gerando um total de mais de 76000 transcritos dentre

mRNA e miRNA. Este transcriptoma foi utilizado para avaliar a expressão dos genes nos diferentes grupos.

As comparações foram realizadas em 3 grupos (DM x CON; DM x PRE; PRE x CON). Para as comparações da expressão dos Genes Diferencialmente Expressos (GDE) foram considerados apenas os mRNA que possuíam um p-valor <0,05 e cuja expressão apresentasse Fold Change (FC) menor que -2,0 ou maior que +2,0.

GPL10233 trata de um microarranjo de miRNA de um segundo grupo de pacientes com as mesmas características do GPL6883 divididos em CON (n= 10); PRE (n=7) e DM (n=9). GPL10233 foi utilizado para avaliar a expressão dos microRNA nos diferentes grupos.

As comparações foram realizadas em 3 grupos (DM x CON; DM x PRE; PRE x CON). Para miRNA foram consideradas as sondas que apresentaram p-valor <0,5 e FC menor que -1,5 ou maior que +1,5, considerando uma menor abundância de miRNA em relação a mRNA.

O FC foi calculado pela ferramenta GEO2R disponível por Gene Expression Omnibus (GEO) em (www.ncbi.nlm.nih.gov/geodatasets/).

5.2 IDENTIFICAÇÃO DE microRNA DE ALTA CONFIANÇA

Os microRNAs diferencialmente expressos (MDE) foram classificados utilizando a versão do 22 miRBase, onde estão catalogados miRNAs precursores e maduros do genoma humano. Foram utilizados como parâmetro os miRNAs classificados nesta ferramenta como de alta confiança (*high confidence*), segundo critérios de mapeamento das reads e dados de sequenciamento. miRNA *high confidence* são aqueles que já foram previamente identificados e validados por outros trabalhos científicos.

5.3 ANÁLISE DOS GENES ALVOS

Após identificação dos MDE *high confidence*, foi utilizada a ferramenta de análise miRWalk 3.0 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) para verificar os mRNA alvos dos MDE.

5.4 CONSTRUÇÃO DA REDE miRNA-mRNA

Foi construída uma rede de interações entre GDE e MDE através do programa Cytoscape v.3.7.2. A rede apresenta os miRNA como atributo e os GDE modulados por seus respectivos miRNA como alvos. miRNA e mRNA são representados pelos nodos, enquanto as linhas indicam as interações existentes entre eles.

5.5 ANÁLISE DO ENRIQUECIMENTO DE VIAS

Os GDE que eram alvos do MDE foram analisados segundo software de enriquecimento de vias não rankeada, Enrichr (disponível em: <https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) para verificar se a expressão gênica dos indivíduos era consistente com a doença estudada.

A ontologia de genes foi gerada a partir da expressão dos genes únicos utilizando a ferramenta webgestalt disponível em: <http://www.webgestalt.org/>

Posteriormente, foi realizado o agrupamento da rede com auxílio do aplicativo para cytoscape denominado CytoHubba, utilizando a base de cálculo “Maximal Click Centrality” (MCC) para identificação do eixo ou ponto central (hub) de miRNA e mRNA. Os genes presentes no hub foram utilizados para análise de enriquecimento de vias classificadas (ranked) através do software Gene set Enrichment Analysis (GSEA) v4.0.3. As vias foram identificadas com base no banco de dados da Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG). Apenas as vias com valor de $p > 0,05$ segundo análise do GSEA foram escolhidas.

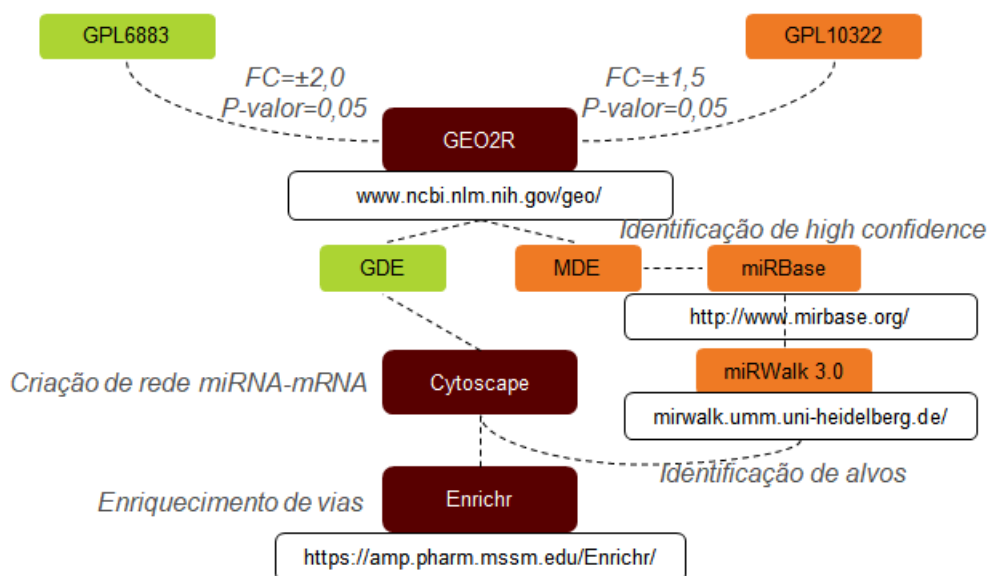


Figura 5-2: Fluxograma das análises conduzidas no transcriptoma para identificação dos GDE e MDE

5.6 ANÁLISE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Os miRNA presentes na rede de genes Hubs foram avaliados quando à sensibilidade e especificidade com base na intensidade de sinal de cada amostra através da ferramenta estatística SPSS 20.0. Foi realizada a análise da curva de Características Operacionais do Receptor (ROC, do inglês Receiver Operational Characteristics Curve). O padrão ouro determinado foi o diagnóstico clínico de pré-diabetes com base na glicemia de jejum e hemoglobina glicada. A área sob a curva (AUC, do inglês area under the curve) de cada miRNA foi avaliada e foram escolhidos os miRNA que apresentaram AUC maior ou igual a 0.7 e valor de $p < 0,05$.

5.7 ANÁLISE DAS VIAS MODULADAS PELOS miRNA BIOMARCADORES

Após identificação dos miRNA com alta sensibilidade e especificidade para o pré-diabetes, foi realizada uma análise das vias semelhantes aos dois miRNA através da ferramenta miRPath disponível em: <http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>.

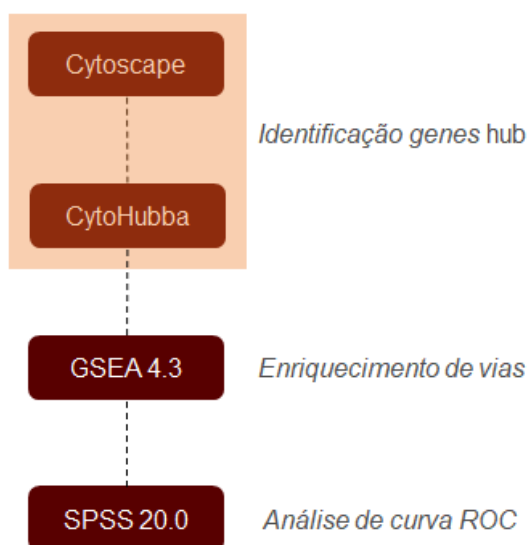


Figura 5-3: Fluxograma conduzido para identificação dos biomarcadores

6. RESULTADOS

6.1 IDENTIFICAÇÃO DOS microRNA DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

O conjunto de dados referente ao código de acesso GSE21321 foi analisado para identificar o perfil de expressão dos miRNA entre indivíduos saudáveis, pré-diabéticos e diabéticos. 33 miRNA *high confidence* encontram-se positivamente modulados entre os grupos PRE x CON e apenas 2 entre os grupos DM x CON, e nenhum miRNA encontra-se negativamente modulado em nenhuma das duas comparações (Figura 9: A e B). Na figura 9-D temos um *violin plot* demonstrando o grau de perturbação entre os grupos. O estágio de pré-diabetes apresenta maior alteração no perfil de expressão dos miRNA em relação aos indivíduos saudáveis e pacientes diabéticos. Os pacientes não estavam sob uso de medicações ao longo do estudo.

Destaca-se na comparação entre o grupo DM x CON o aumento do miRNA-550 que não estava presente entre os grupos PRE x CON. O aumento na expressão do miR-30d observada na comparação entre os grupos PRE X CON foi abolida na comparação entre os grupos PRE X DM, retornando aos níveis basais (Figura 9C).

Uma vez que os resultados referentes à identificação dos miRNA diferencialmente expressos revelou que a maior alteração na expressão é observada em indivíduos pré-diabéticos, investigou-se neste estudo o potencial destes miRNA como biomarcadores.

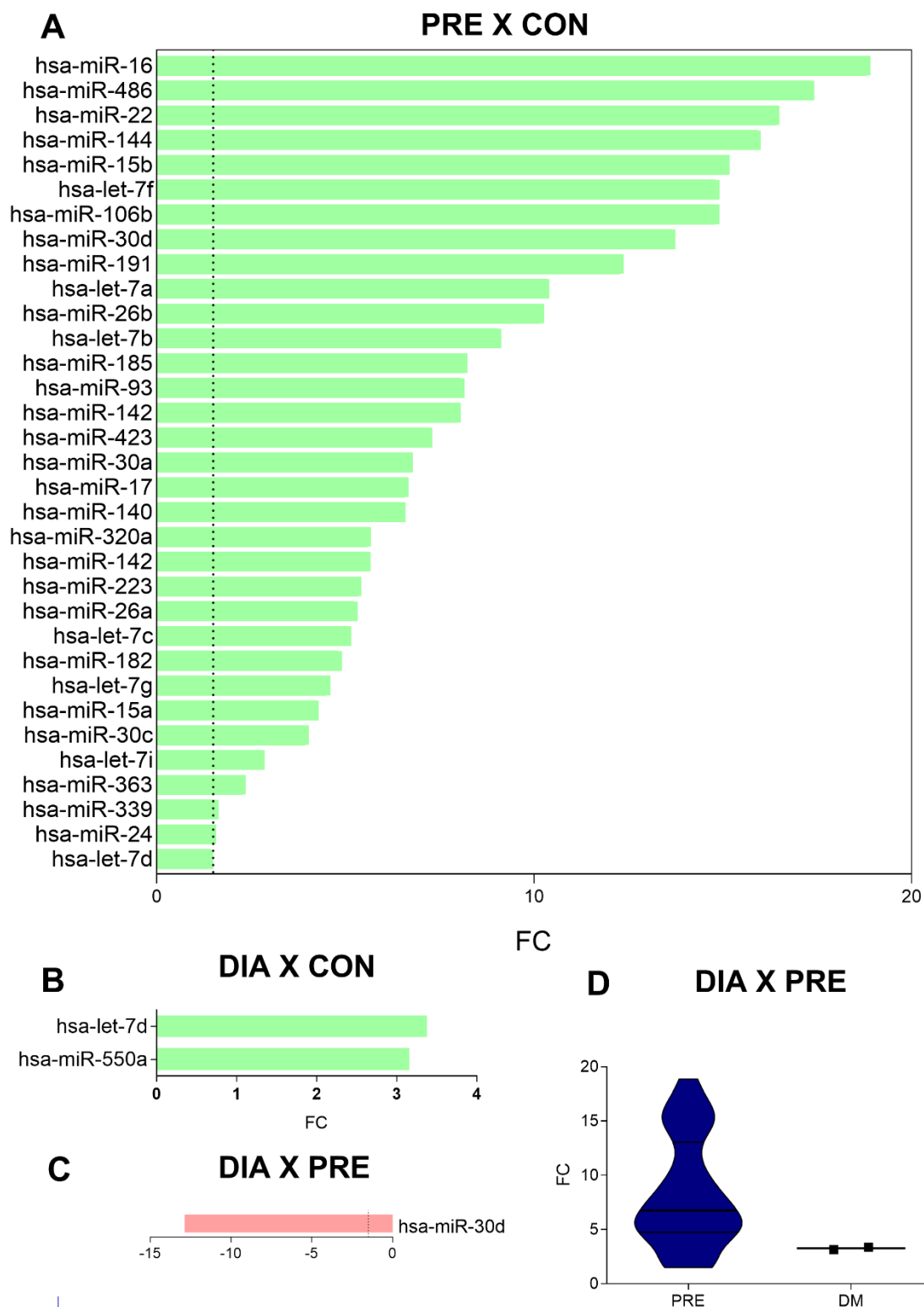


Figura 5-4: Comparação das expressões dos miRNA entre os grupos Pré-diabéticos (PRE), Diabético (DM) e Controle (CON). No eixo Y temos os miRNA e no eixo X o valor de expressão em Fold Change (FC) A figura A mostra os miRNA diferencialmente expressos entre os grupos PRE x CON. B mostra os miRNA diferencialmente expressos entre os Grupo DM x CON. C mostra a comparação entre os grupos DM x PRE. Em D temos a diferença de alterações entre os grupos DM e PRE em relação ao controle.

6.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MRNA ALVOS E CRIAÇÃO DA REDE DE INTERAÇÃO miRNA-mRNA EM INDIVÍDUOS PRÉ-DIABÉTICOS

Os 33 miRNA diferencialmente expressos nos indivíduos pré-diabéticos possuem ao todo 1550 mRNA alvos validados segundo o miRWalk v.3.0. Destes alvos, 185 mRNA encontraram-se modulados nos transcriptomas utilizados neste estudo, apresentando um total de 761 interações miRNA-mRNA (Figura 10).

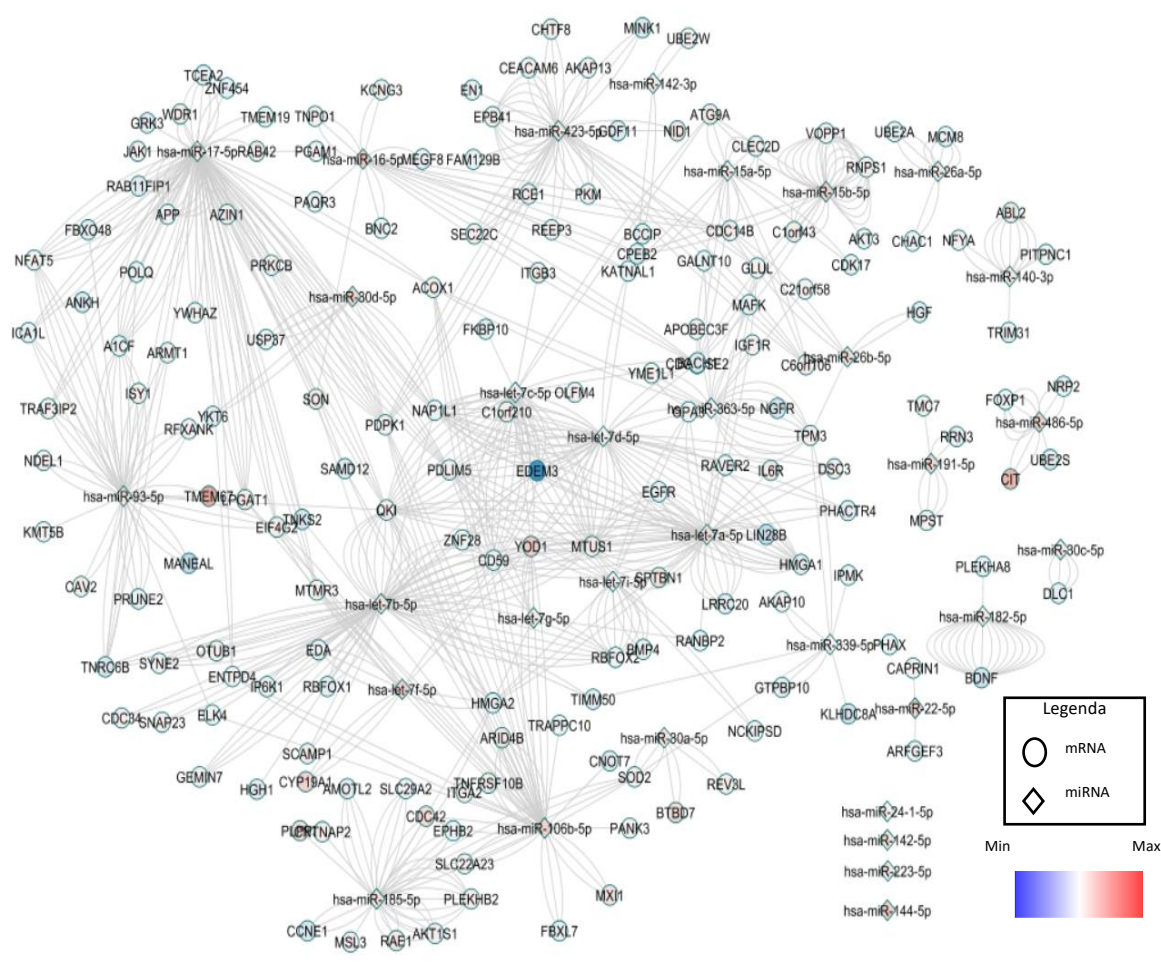


Figura 5-5: Rede de interações entre miRNA e mRNA. Os pontos vermelhos representam os 33 miRNA diferencialmente expressos. Os pontos brancos são os alvos dos miRNA expressos no transcriptoma. Ao total 185 mRNA alvos encontravam-se modulados.

Após identificarmos os GDE, realizamos uma análise de enriquecimento de genes através da plataforma Enrichr, utilizando a Enciclopédia de Genes e Genoma de Kyoto para identificação dos processos biológicos e vias afetadas no pré-diabetes em

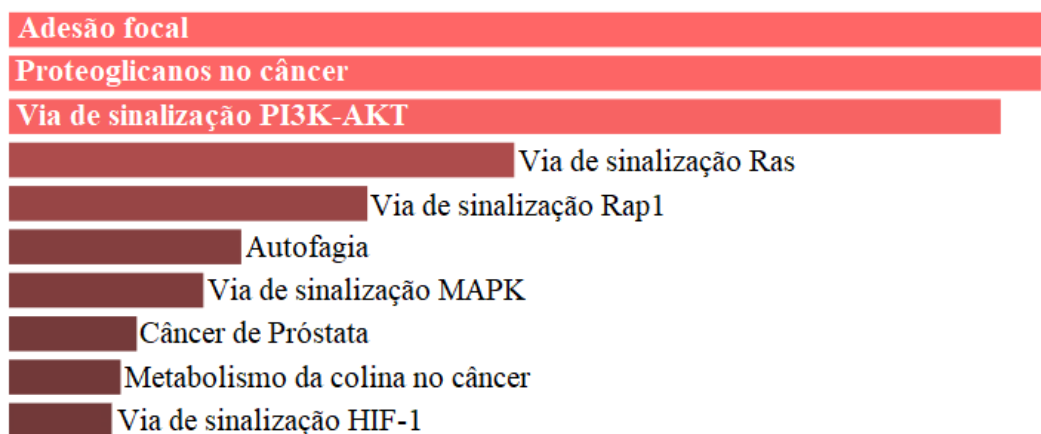


Figura 5-6: Análise de enriquecimento de conjunto de genes através da plataforma Enrichr. As vias estão ordenadas segundo o valor de p da classificação de enriquecimento. O comprimento das barras representa a significância do geneset ou termo. As barras com mais brilhos são as mais significativas.

relação ao controle.

Das 10 principais vias enriquecidas pelo conjunto de genes através da plataforma Enrichr, 7 apresentam relação direta com o DM2 segundo o KEGG *diseases*. As vias de Adesão focal e PI3K-AKT foram as que apresentaram menor valor de p , indicando que são enriquecidas por um maior agrupamento de genes do conjunto (figura 11).

A análise de ontologia de genes indicou que os processos biológicos mais significativos envolviam regulação biológica, processos metabólicos e resposta a estímulos. A maioria dos genes do conjunto estavam relacionados com o núcleo e membrana das células. Quanto a função molecular, aproximadamente 80% dos genes do conjunto estavam envolvidos com ligação de proteínas.

Para identificação dos miRNA e genes mais importantes dessa rede, utilizamos o aplicativo do *Cytoscape* denominado de *CytoHubba*. O *CytoHubba* calcula pontos mais centrais da rede e os genes com maior interação, mostrando também a menor distância entre esses pontos. Dentre os 11 tipos de cálculos disponíveis no *CytoHubba*, o *Maximal Click Centrality* (MCC), foi recém reportado

como o que apresenta maior acurácia (CHIN et al., 2014) e, portanto, foi o método escolhido para esse estudo. O ponto central (*hub*) de maior importância apresentou 5 miRNA (hsa let-7a-5p; hsa let-7b-5p; hsa miR17-5p; hsa miR93-5p, e; hsa miR106-5p) e 83 GDE conforme figura 12.

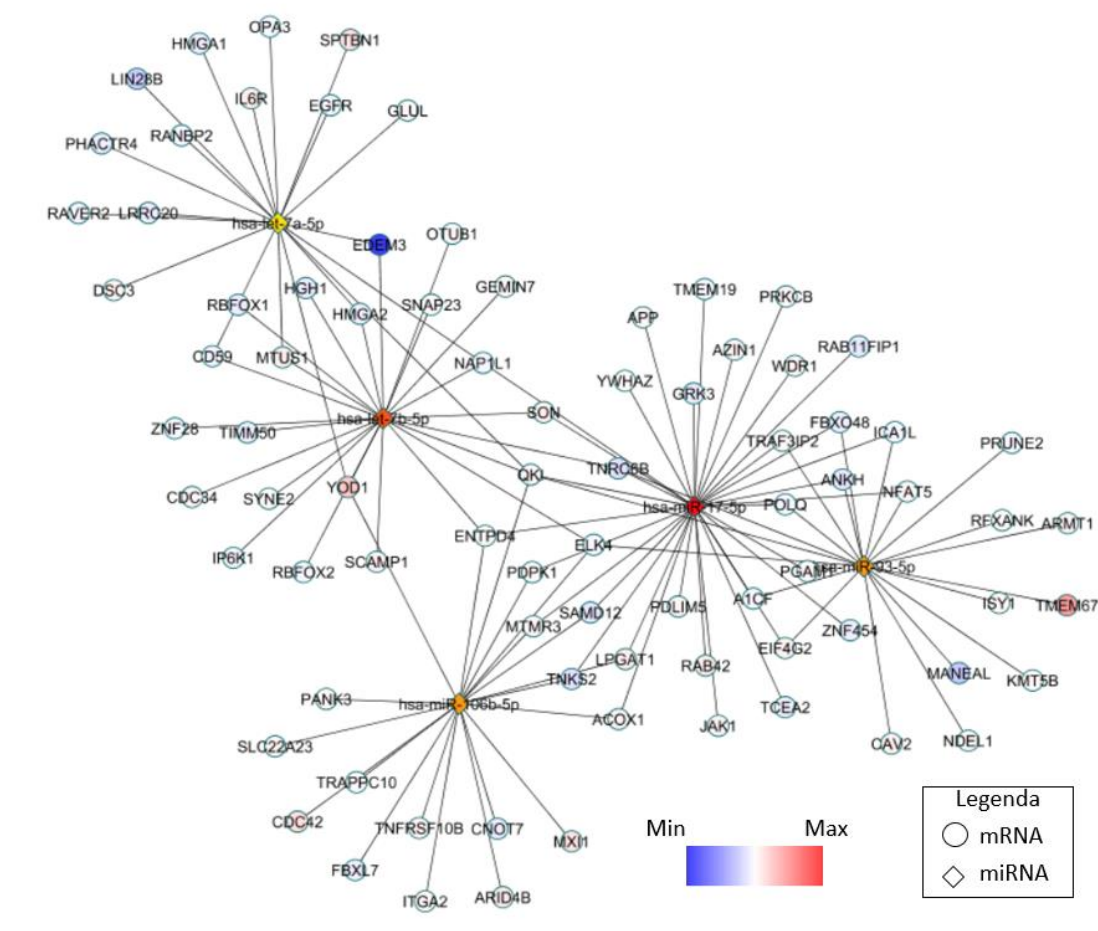


Figura 5-7 Hub network de maior importância segundo MCC. Em vermelho encontram-se os 5 miRNA diferencialmente expressos que apresentam maior pontuação de centralidade e em azul os genes alvos, diferencialmente expressos, modulados nos indivíduos pré-diabéticos.

A análise de enriquecimento do conjunto de genes Hub através do GSEA demonstrou uma redução da ativação das vias de sinalização de mTOR e insulina e aumento da sinalização de proteólise mediada por ubiquitina e glicólise/gliconeogênese (Figura 13).

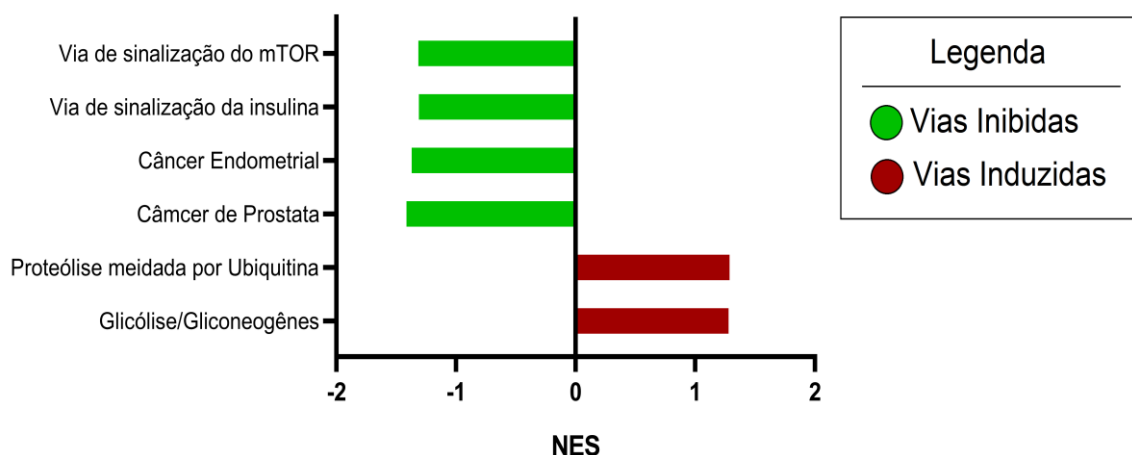


Figura 5-8: Análise de enriquecimento de conjunto de genes obtido através do GSEA 4.0.3 utilizando a intensidade de sinal dos hub genes.

6.3 ANÁLISE DE CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DO RECEPTOR (ROC)

Para identificar possíveis biomarcadores de diagnóstico precoce de DM em indivíduos pré-diabéticos, foi realizada uma análise da sensibilidade e especificidade de cada miRNA com base na intensidade de sinal normalizada de cada amostra com base na curva ROC, com auxílio do software de análise estatística SPSS 20.0. Com base nos valores obtidos foram selecionados aqueles que apresentavam área sob a curva (AUC) acima de 0,7 e $p\text{-valor} < 0,05$ conforme apresentado na figura 14.

A tabela 1 apresenta os valores da área sob a curva, erro e desvio padrão e intervalo de confiança dos miRNA possíveis biomarcadores do estado de pré-diabetes. Os 5 miRNA previamente identificados pela análise de centralidade, também apresentaram em conjunto, boa especificidade e sensibilidade para identificar o estado de pré-diabetes. Dentre eles, os miR-93 e Let-7a apresentaram os melhores valores de sensibilidade e especificidade isoladamente.

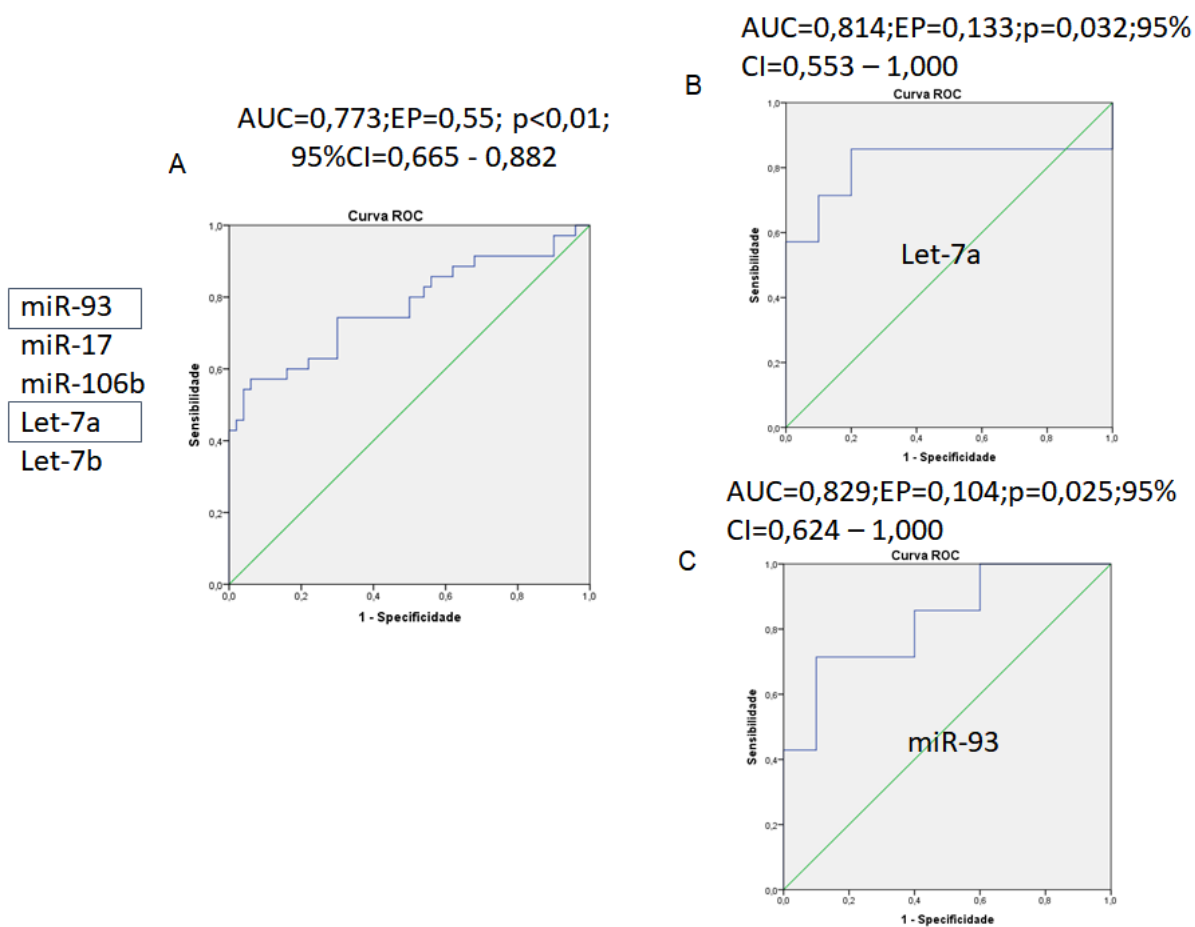


Figura 5-9: Análise de sensibilidade e 1-especificidade do conjunto de miRNA hub identificados pelo cytohubba (A). B e C mostram a área sob a curva (AUC) dos dois miRNA que isoladamente apresentaram valores maiores que 0,7 e p-valor <0,05. A linha verde significa a distribuição normal.

7. DISCUSSÃO

Até o presente momento não há um recurso laboratorial que identifique entre os indivíduos pré-diabéticos quais desenvolverão DM2 ou não. Esta discriminação baseada em marcadores biológicos pode ser um fator contribuinte para desaceleração na marcha crescente da incidência do DM. Neste contexto, torna-se importante investigar biomarcadores que possam predizer acerca de indivíduos pré-diabéticos com maior probabilidade em desenvolver DM2. Além disso, os biomarcadores clássicos como hemoglobina glicada e glicose de jejum são úteis para identificar o pré-diabetes apenas em estado tardio, quando o pâncreas já não é capaz de compensar a resistência insulínica (VAISHYA; SARWADE; SESHADRI, 2018), sendo então um período de início da morte das células beta e aparecimento de comorbidades (BUTLER et al., 2003).

Os miRNA são apontados como importantes reguladores de processos biológicos, agindo como inibidores do processo de translação, sendo potenciais candidatos a biomarcadores e alvos terapêuticos. Até o momento, grande parte dos estudos buscou definir o painel de expressão diferencial de miRNA entre indivíduos diabéticos e saudáveis, visando estabelecer uma correlação entre as alterações na expressão do miRNA com o desenvolvimento do DM, seja em estudos pré-clínicos ou clínicos. Contudo, diante do aumento vertiginoso de pessoas acometidas por DM2 e da crescente estimativa de novos casos, torna-se urgente definir estratégias para detecção de indivíduos pré-diabéticos em maior risco de evoluir para o DM2, doença crônica com comprometimento sistêmico e curso fatal. Por isto, o presente estudo avaliou o perfil de expressão dos miRNA em indivíduos saudáveis (CON), pré-diabéticos (PRE) e diabéticos (DM), e sua correlação com as vias intracelulares associadas ao desenvolvimento do DM2.

O conjunto de dados utilizado na análise desse trabalho foi disponibilizado pelo grupo de Karolina e colaboradores (2011). Na análise deste grupo foi identificado um perfil de microRNA capaz de prever o aparecimento de diabetes em camundongos e, posteriormente, validado em humanos. Também foi identificado a importância do miR-144 na sinalização de insulina. Neste trabalho, foi realizada uma nova avaliação deste mesmo conjunto de dados à luz dos novos conhecimentos sobre microRNA e disponibilidade de novos programas e metodologias de análise em bioinformática

permitindo uma reinterpretação dos dados obtidos e a proposição de um perfil baseado na influência dos miRNA no transcriptoma humano.

Inicialmente, identificou-se os miRNA diferencialmente expressos entre os três grupos de indivíduos. Na comparação entre os grupos PRE x CON, foram identificados 33 miRNA *high confidence* positivamente modulados e apenas 2 entre os grupos DM x CON. Os indivíduos do estágio pré-diabetes apresentam maior alteração no perfil de expressão dos miRNA em relação aos indivíduos saudáveis e pacientes diabéticos. Isto é um indicativo de que neste período diversos mecanismos fisiológicos compensatórios são acionados para manutenção da homeostase do organismo. Ghai et al (2019), comparando o espectro de miRNA entre indivíduos pre-diabéticos que evoluíram ou não para o DM2, identificaram 57 miRNA diferencialmente expressos entre estes dois grupos, bem como, demonstraram que a expressão de 26 miRNA sofre alterações face à obesidade.

No presente estudo, o conjunto de dados GSE21321 que possui um microarranjo com 6879 sondas de miRNA foi utilizado para avaliar a diferença do perfil de expressão dos miRNA circulantes em indivíduos saudáveis, pré-diabéticos e diabéticos. Um total de 33 miRNA encontravam-se diferencialmente expressos entre os grupos CON x PRE e 2 miRNA entre os grupos CON x DM. Contudo, diferentes assinaturas de miRNA já foram publicadas para o DM2 ou pré-diabetes, mas ainda não existe uma consonância entre os dados apresentados por diversos estudos (VASU et al., 2019). Dos 33 miRNA diferencialmente expressos no pré-diabetes, 28 já foram previamente associados com o DM2 (HE et al., 2017).

As diferenças no perfil de expressão dos miRNA nos estudos realizados podem ser explicadas pela diversidade nas técnicas aplicadas para identificação dos miRNA, por diferentes estadiamentos da doença, por diferentes características populacionais ou, até mesmo, pelo tamanho das amostras utilizadas (VAISHYA; SARWADE; SESHADRI, 2018). Neste estudo, observou-se que a perturbação acentuada na expressão dos miRNA observada em indivíduos pré-diabéticos sugere a ativação de mecanismos compensatórios em resposta ao estresse metabólico e imunológico decorrentes do crescente nível de glicose e lipotoxicidade.

A exemplo disso tem-se a expressão diferencial do miRNA-30d identificado entre os 33 miRNA alterados no grupo pré-diabético. Na população do estudo, o miR-30d tem sua expressão aumentada no pré-diabetes e reduzida aos níveis basais no

grupo diabético. O miR-30d está associado ao aumento da transcrição da insulina em resposta a hiperglicemia e tem sua expressão inibida por TNF- α conforme mecanismo proposto por Zhao e colaboradores (2012).

TNF- α tem sido reportado como um dos mais importantes mediadores inflamatórios e está relacionado com o desenvolvimento da resistência insulínica e patogênese do DM2 (AKASH; REHMAN; LIAQAT, 2018; MOLLER, 2000). Peculiarmente, um recente estudo de Wang e colaboradores (2018) evidenciou que os níveis de TNF- α estão significativamente elevados em pacientes recém diagnosticados com DM2 em relação ao controle saudável, e não se encontravam significativamente elevados em indivíduos pré-diabéticos em relação ao controle. No entanto, o aumento de TNF- α era progressivo e acompanhava o aumento da hiperglicemia, redução de adiponectina e, conseqüentemente, progressão da doença. Outros estudos também identificaram o aumento do miR-30d em indivíduos pré-diabéticos ou recém diagnosticados com DM2 (DE CANDIA et al., 2017; KONG et al., 2011). Isso corrobora a hipótese de que a expressão elevada do miR-30d nestes indivíduos pode ser decorrente da ausência do estado crônico inflamatório de baixo grau sustentado por níveis circulantes alterados de citocinas inflamatórias, como detectado em indivíduos diabéticos.

miRNA circulantes diferencialmente expressos descritos neste estudo também estão associados à obesidade, como o miR-17 que está diretamente relacionado com adipogênese (WANG et al., 2008), mas outros miRNA como o 15b, 93, 140, foram também previamente associados ao sobrepeso (ALVES et al., 2019), corroborando com o estudo de Ghai et al (2019). Para identificar se os miRNA diferencialmente expressos estavam relacionados ao DM2, foi criada uma rede de interações miRNA-mRNA com intuito de identificar quais alvos dos miRNA estavam modulados na população deste estudo. Após a criação da rede de interações, os 185 genes alvos modulados foram utilizados para enriquecimento de vias através da plataforma Enrichr. Dentre as 10 principais vias enriquecidas, destacam-se 7 vias associadas ao desenvolvimento e progressão do DM2: via de adesão focal, PI3K-AKT, Ras, Rap, Autofagia e HIF-1.

A via de adesão focal está relacionada ao remodelamento do citoesqueleto das células β -pancreáticas e liberação da insulina dependente de glicose (YANG et al., 2016). As proteínas do complexo de adesão focal talina e fosfo-paxilina juntamente

com as integrinas β das células β -pancreáticas são estimuladas pela matriz extracelular dos capilares próximos a estas células e esse mecanismo parece ser necessário para liberação de insulina e pode ser perturbado em situações de doenças. A hiperglicemia crônica foi capaz de reduzir a atividade dessa via em camundongos (GAN et al., 2018).

A via da PI3K-AKT é a principal via envolvida na cascata de sinalização da insulina. A ligação da insulina ao seu receptor ativa a proteína PI3K que leva a ativação da AKT que vai ser responsável pela ativação de diversos fatores, incluindo mTOR, GSK3, Rab, FOXO dentre outros (MANNING; TOKER, 2018). A alta ingestão calórica, como visto nos processos de sobrepeso e obesidade, aumenta a ativação das vias de PI3K-AKT via hiperinsulinemia ou hiperamioacidemia. A hiperativação da via de PI3K-AKT pode levar a ativação da GSK3, também previamente associada ao DM2 (LIU; YAO, 2016), e a hiperativação do mTOR que pode gerar resistência insulínica por retroalimentação negativa do IRS-1 (MANNING; TOKER, 2018; YOON, Mee Sup, 2017). É provável que o aumento dos miRNA circulantes que visam a diminuição dessas vias estejam associados a mecanismos compensatórios à resistência insulínica.

As Ras são pequenas proteínas GTPases que estão envolvidas na ativação de diversas vias incluindo PI3K-AKT, AMPK, mTOR e regulam diversas respostas celulares como diferenciação, sobrevivência e proliferação (SCHUBBERT; SHANNON; BOLLAG, 2007).

Rap1, proteína repressora-ativadora (do inglês: repressor-activator protein) é uma proteína envolvida na estabilidade e regulação de telômero de DNA (CAI et al., 2017). A redução de telômeros de DNA está associado a obesidade e cardiomiopatia diabética (WULANINGSIH et al., 2016). Sua expressão também está passivamente associada expressão de genes glicolíticos em *S. cerevisiae* (BITTER; CHANG; EGAN, 1991) e a proteção não telomérica contra obesidade (YEUNG et al., 2013).

Autofagia é um processo biológico essencial que resulta na degradação de proteínas redundantes, organelas defeituosas e moléculas solúveis (TURKMEN, 2017). Fujitani e colaboradores (2009) demonstraram que o papel da autofagia em níveis basais é de suma importância para manutenção das células β em camundongos, e que o aumento dos níveis de autofagia são um mecanismo de defesa contra a alta ingestão de nutrientes para preservação da saúde das células β . No

presente estudo a via de autofagia se encontra reduzida. É possível que a redução da via da autofagia seja uma das primeiras causas na redução da massa de células β que ocorre ainda no estado de pré-diabetes.

HIF-1 é o nome dado as vias dos fatores induzidos por hipóxia. No DM ocorre um fenômeno chamado pseudohipóxia, caracterizado por um aumento na proporção de NADH/NAD⁺ devido ao aumento do influxo da via do poliol (WILLIAMSON et al., 1993). Em situações de hipóxia as proteínas hif-1 α e hif-1 β migram para o núcleo onde ligam-se ao Elemento Responsível a Hipóxia (ERH) no DNA e passam a funcionar como fator de transcrição para aumentar a transcrição de genes ligados a eritropoiese, angiogênese e sobrevivência celular (CERYCHOVA; PAVLINKOVA, 2018). É esperado um aumento da via HIF-1 em resposta a resistência insulínica, no entanto, o estado de hiperglicemia pode induzir a degradação da proteína hif-1 α dificultando a resposta à hipóxia no DM (RAMALHO et al., 2017). Os mecanismos pelos quais os miRNA modulam negativamente a via HIF-1 no pré-diabetes ainda não são compreendidos.

A análise de ontologia de genes revelou que os miRNA tem como alvos processos biológicos envolvidos com regulação biológica, processos metabólicos e resposta a estímulos. Isso sumariza as vias enriquecidas por Enrichr. principalmente a via da PI3K-AKT. Os componentes celulares e funções molecular alvos também estão de acordo com as vias enriquecidas evidenciando que os alvos afetam principalmente genes de resposta a estímulo a fatores de transcrição.

Os *hub genes* foram utilizados para identificar os mRNA e miRNA que apresentavam um papel mais central na rede de interações. Genes que apresentam maior quantidade de correlações, tendem a ser fundamentais para esta rede (CHIN et al., 2014). Cinco miRNA foram identificados por possuírem correlação segundo o *score* de centralidade definido por MCC: miR-17, Let-7b, miR-93, miR-106b e Let-7a. Todos estes 5 miRNA foram previamente associados ao DM2 (HE et al., 2017). Os mRNA presentes na rede *hub* são aqueles diferencialmente modulados no transcriptoma analisado neste estudo. Logo, os miRNA que apresentaram maior correlação foram aqueles que de fato mais influenciaram na transcrição destes genes.

Para identificar o impacto desses 5 miRNA na transcrição dos genes, foi realizada uma análise de enriquecimento de conjunto de genes levando em conta a intensidade de sinal dos genes do *hub* nos indivíduos saudáveis e pré-diabéticos. O

enriquecimento demonstrou uma redução na atividade das vias de mTOR e sinalização de insulina, e um aumento das vias de proteólise e glicólise/gliconeogênese. Isto está de acordo com o que foi previamente discutido e demonstra que, de fato, os miRNA identificados na rede Hub estão envolvidos no processo de patogênese de DM2.

A análise da curva ROC dos 5 miRNA da rede hub revelou que o perfil identificado pela análise de centralidade apresentaram boa sensibilidade e especificidade para diagnóstico do estado de pré-diabetes, sendo que, isoladamente, os miR-93 e let-7a apresentaram melhor área sob a curva dentre os 5 miRNA analisados (p -valor $<0,05$) podendo servir como biomarcadores de diagnósticos para o pré-diabetes. No presente estudo tanto o miR-93 quanto o Let-7a possuem sua expressão significativamente aumentada no pré-diabetes, e embora continuem aumentada no DM2, não apresentaram diferença significativa tanto ao grupo CON quanto ao grupo PRE.

O miR-93 foi previamente identificado em indivíduos com risco de desenvolvimento de DM2. Em tal estudo, o miR-93 apontava como um possível bom marcador de diagnóstico e acompanhamento uma vez que se encontrava aumentado em indivíduos com risco para DM2 e reduzido após 12 meses de intervenção com atividade física (FLOWERS et al., 2017). No entanto, um outro estudo conduzido no mesmo ano na Flórida reportou que o miR-93 possuía sua expressão reduzida quando comparados indivíduos obesos eutróficos (NUNEZ LOPEZ; GARUFI; SEYHAN, 2017). Chen e colaboradores (2013) demonstraram que a super expressão do miR-93 estava fortemente associada a redução da transcrição do GLUT-4 e ser um dos possíveis mecanismos para indução da resistência insulínica na síndrome do ovário policístico. Ao que parece o miR-93 pode estar ligado as fases precoces da resistência insulínica, porém mais estudos robustos com maior número de participantes são necessários para confirmar esta hipótese.

A família Let-7 tem sua expressão alterada em uma ampla lista de doenças metabólicas, sobretudo no DM (HE et al., 2017; VASU et al., 2019). Assim como o miR-93 o Let-7a possuiu sua expressão significativamente aumentada no pré-diabetes em relação ao controle, mas não nos demais grupos. Curiosamente, Zhou e colaboradores (2013) encontraram um aumento da expressão do Let-7a no DM em relação ao controle, porém este miRNA encontrava-se significativamente reduzido no

DM em relação aqueles que apresentavam DM e nefropatia diabética. Já o grupo de Santovito (2014) encontrou uma redução nos níveis de Let-7a no grupo DM em relação ao controle e verificou um aumento desses níveis após 12 meses de tratamento anti-diabético. Esses resultados sugerem a hipótese de que o Let-7a pode ser um marcador de fase aguda e tem sua expressão reduzida à medida que o DM avança, ou pode reduzir em diferentes fenótipos do DM2, no entanto não temos informações sobre o estadiamento do DM2 nos pacientes do presente estudo para confirmar esta hipótese. O Let-7b também já foi identificado alterado em pacientes com DM2. Liang et al., (2018) identificaram um perfil de expressão de 6 miRNA capazes de discriminar indivíduos com DM2 de indivíduos saudáveis (Let-7b, Let-7i, miR-142, miR-144 miR-155 e miR-29a). Vale salientar que os indivíduos selecionados para o estudo de Liang et al., (2018) era recém diagnosticados com DM2, isso explicaria porque no presente estudo, os níveis de Let-7b não foram detectados no grupo DM x CON e sim no grupo PRE x CON.

O miR-17 é um miRNA muito expresso em adipócitos. Estudo da Karolina et al., (2012) evidenciou que o miR-17 encontrava-se desregulado em exossomos de pacientes com síndrome metabólica (mets) e hipercolesterolemia, porém não era diferencialmente expresso no *cluster* contendo mets e DM2. Wu e colaboradores (2015) também encontraram aumento da expressão do miR-17 em indivíduos obesos em relação a indivíduos com DM2 enquanto que Kloting et al., (2009) encontraram aumento da expressão do miR-17 em adipócitos de indivíduos pré-diabéticos em relação a indivíduo com DM2. Quando comparados os indivíduos pré-diabéticos que evoluíram para DM2 ao longo de 5 anos com aqueles que não evoluíram para o DM2, o miR-17 aparece dentre os 26 miRNA que diferem esses grupos (GHAI et al., 2019). O miR-17 também foi capaz de diminuir a expressão de Glut-4 em ratos e induzir a resistência insulínica (XIAO et al., 2018). Juntas, essas informações sugerem que o miR-17 circulante em exossomos é oriundo do tecido adiposo e pode estar relacionado com aspectos da resistência insulínica relacionados a obesidade. Além disso, pode estar associado com indivíduos pré-diabéticos que irão progredir para o estágio de DM2, configurando, portanto, um importante biomarcador para antever o diabetes mellitus tipo 2.

O aumento da expressão do miR-106b também já foi previamente evidenciado. O miR-106b tem como um dos seus alvos o transportador de glicose Glut-4. E foi

verificado em células musculares simulando condições de resistência insulínica, que o aumento da expressão do miR-106b mitigava a expressão do Glut-4, e que era normalizada após a inibição do mesmo por seu anti-miRNA (ZHOU et al., 2016).

Dentre os 33 miRNA previamente identificados na primeira fase do nosso estudo, os miR-30d, miR-144 e miR-182 foram diversas vezes mencionados em outros estudos (GHAJ et al., 2019; KAROLINA et al., 2011, 2012; KLÖTING et al., 2009; LIANG et al., 2018). Portanto, apesar de terem sido excluídos na etapa de análise de centralidade, a análise de sensibilidade e especificidade revelaram uma área sob a curva de 1,0 para esses 3 miRNA (dados no anexo I). A escassez de alvos validados para esses miRNA junto com a ausência de mRNA modulados no presente transcriptoma levaram a exclusão dos mesmos segundo o desenho no atual estudo, porém, devido a alta sensibilidade e especificidade para identificação do estado do pré-diabetes, e grande quantidade de estudos identificando a participação dos mesmos na fisiopatologia do DM2, é do entendimento desse grupo que estes miRNA devem ser levados em consideração para futuras análises.

Uma limitação do presente estudo é que não foi possível realizar correlacionar os valores de expressão dos miRNA identificados no estudo com parâmetros bioquímicos como glicemia de jejum, hemoglobina glicada ou índice-homa, que trariam mais robustez ao resultado, devido a ausência desses valores individuais no dataset GSE21321. Em adição, a falta de outros dataset avaliando miRNA circulantes para o pré-diabetes e DM2 inviabilizou comparações entre o presente achado com demais resultados de outros grupos, impossibilitando uma validação do nosso perfil de expressão de miRNA para o pré-diabetes.

Embora os resultados deste estudo sejam promissores, nossa análise é exploratória sendo necessário coortes mais robustas com um maior número de participantes para validar esses dados. Entendemos também que as divergências nas assinaturas de miRNA para o DM2 podem, além do já previamente discutido, causadas por diferentes fenótipos da doença, com acometimento de diferentes tecidos e portanto, diferente expressão de miRNA.

8. CONCLUSÃO

Através da análise de bioinformática de um conjunto de dados previamente disponibilizado publicamente, é possível sugerir que alterações no perfil de miRNA de pacientes pré-diabéticos levam ao comprometimento de vias relacionadas a resistência insulínica, liberação de insulina e mecanismos possivelmente relacionados à apoptose das células beta, contribuindo para o desenvolvimento do DM.

- ▶ A análise de centralidade identificou cinco miRNA - miR-17, Let-7b, miR-93, miR-106b e Let-7a, como tendo um papel mais central na rede de interações.
- ▶ Os alvos dos miRNA identificados apresentaram correlação com a patogênia do DM2.
- ▶ Os cinco miRNA identificados pela análise de centralidade apresentaram boa especificidade e sensibilidade para identificar o estado de pré-diabetes.
- ▶ Os miR-93 e Let-7a apresentaram os melhores valores de sensibilidade e especificidade isoladamente.

Estes resultados colaboram para o entendimento do papel dos miRNA no estado pré-diabetes e no desenvolvimento DM2 e que irá ajudar na construção de um perfil de assinatura para o diagnóstico precoce da doença.

9. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados desse trabalho, objetivamos investigar o papel funcional dos miRNA no desencadeamento do DM2 pela validação do padrão de expressão de miRNAs em uma coorte de indivíduos saudáveis, pré-diabéticos e diabéticos, em um projeto em parceria com Fiocruz e CEDEBA, identificando a identidade do perfil de miRNA da nossa população e comparando com os demais perfis já publicados.

Objetivamos também identificar mecanismos através de cultura de célula muscular simulando o estado de pré-diabetes transfectadas com os miRNA identificados.

10. REFERÊNCIAS

- ABDUL-GHANI, Muhammad A.; DEFRONZO, Ralph A. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.
- AKASH, Muhammad Sajid Hamid; REHMAN, Kanwal; LIAQAT, Aamira. Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 105–110, 2018.
- ALLAMAN, Igor; BÉLANGER, Mireille; MAGISTRETTI, Pierre J. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. FEB, p. 1–12, 2015.
- ALVES, João Manuel et al. Mapping Research in the Obesity, Adipose Tissue, and MicroRNA Field: A Bibliometric Analysis. **Cell**, v. 8, n. 1581, 2019.
- AMARAL, Bruna et al. MicroRNAs - biogênese, funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. **Odontologia Clínico-Científica (Online)**, v. 9, n. 2, p. 105–109, 2010.
- BANG, Claudia; THUM, Thomas. Exosomes: New players in cell-cell communication. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 44, n. 11, p. 2060–2064, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.08.007>>.
- BERNSTEIN, Emily et al. Dicer is essential for mouse development. **Nature Genetics**, v. 35, n. 3, p. 215–217, 2003.
- BHASKARAN, M.; MOHAN, M. MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. **Vet Pathol.**, v. 51, n. 4, p. 759–774, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.
- BHATIA, Parnika et al. miRNAs: early prognostic biomarkers for Type 2 diabetes mellitus? **Future Medicine**, v. 9, n. 10, p. 1025–1040, 2015.
- BITTER, Grant A.; CHANG, Kenneth K.H.; EGAN, Kevin M. A multi-component upstream activation sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 231, n. 1, p. 22–32, 1991.
- BJØRGE, I. M. et al. Extracellular vesicles, exosomes and shedding vesicles in regenerative medicine-a new paradigm for tissue repair. **Biomaterials Science**, v. 6, n. 1, p. 60–78, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/c7bm00479f>>.
- BOBRIE, Angélique et al. Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. **Traffic**, v. 12, n. 12, p. 1659–1668, 2011.
- BROWNLEE, Michael et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 787–790, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10783895>><<http://www.nature.com/doi/10.1038/35008121>>.
- BUTLER, Alexandra E. et al. B-Cell Deficit and Increased B -Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 52, p. 102–110, 2003.

- BUYSSCHAERT, Martin et al. Prediabetes and associated disorders. **Endocrine**, v. 48, n. 2, p. 371–393, 2015.
- CAI, Yin et al. Decoding telomere protein Rap1: Its telomeric and nontelomeric functions and potential implications in diabetic cardiomyopathy. **Cell Cycle**, v. 16, n. 19, p. 1765–1773, 2017.
- CERYCHOVA, Radka; PAVLINKOVA, Gabriela. HIF-1, metabolism, and diabetes in the embryonic and adult heart. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. AUG, p. 1–14, 2018.
- CHEVILLET, J. R. et al. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 41, p. 14888–14893, 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1408301111>>.
- CHIN, Chia Hao et al. cytoHubba: Identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. **BMC Systems Biology**, v. 8, n. 4, p. S11, 2014. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1752-0509/8/S4/S11>>.
- CHOI, Dong Sic et al. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. **Proteomics**, v. 13, n. 10–11, p. 1554–1571, 2013.
- DE CANDIA, Paola et al. A unique plasma microRNA profile defines type 2 diabetes progression. **Plos One**, v. 12, n. 12, p. e0188980, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0188980>>.
- DEFRONZO, Ralph A. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 58, n. 4, p. 773–795, 2009.
- DEFRONZO, Ralph A.; TRIPATHY, Devjit. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. **Diabetes care**, v. 32 Suppl 2, 2009.
- DEVHARE, Pradip B.; RAY, Ratna B. Extracellular vesicles: Novel mediator for cell to cell communications in liver pathogenesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 60, p. 115–122, 2018.
- DU, Xueliang et al. Inhibition of GAPDH activity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 7, p. 1049–1057, 2003.
- EL ANDALOUSSI, Samir et al. Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 5, p. 347–357, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd3978>>.
- ETHERIDGE, Alton et al. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 717, n. 1–2, p. 85–90, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.004>>.
- FABBRI, Muller. MicroRNAs and mirceptors: A new mechanism of action for intercellular communication. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1737, 2017.
- FANG, Zijian; PYNE, Susan; PYNE, Nigel J. Ceramide and sphingosine 1-phosphate in adipose dysfunction. **Progress in Lipid Research**, v. 74, p. 145–159, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.04.001>>.
- FITZNER, Dirk et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by

macropinocytosis. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 3, p. 447–458, 2011.

FLOWERS, E. et al. Preliminary evidence supports circulating microRNAs as prognostic biomarkers for type 2 diabetes. **Obesity Science & Practice**, v. 3, n. 4, p. 446–452, 2017.

GAN, Wan Jun et al. Local Integrin Activation in Pancreatic β Cells Targets Insulin Secretion to the Vasculature. **Cell Reports**, v. 24, n. 11, p. 2819–2826.e3, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.035>>.

GARBER, Alan J. et al. Diagnosis and management of prediabetes in the continuum of hyperglycemia - When do the risks of diabetes begin? A consensus statement from the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists. **Endocrine Practice**, v. 14, n. 7, p. 933–946, 2008.

GE, Qian et al. Exosome-Like Vesicles as New Mediators and Therapeutic Targets for Treating Insulin Resistance and β -Cell Mass Failure in Type 2 Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes Research**, v. 2019, p. 1–7, 2019.

GHAI, Vikas et al. Circulating RNAs as predictive markers for the progression of type 2 diabetes. n. June 2018, p. 2753–2768, 2019.

GIRI, Biplab et al. Chronic hyperglycemia mediated physiological alteration and metabolic distortion leads to organ dysfunction, infection, cancer progression and other pathophysiological consequences: An update on glucose toxicity. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, n. July, p. 306–328, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.157>>.

GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 90001, p. D140–D144, 2006.

GUAY, Claudiane et al. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? **Translational Research**, v. 157, n. 4, p. 253–264, 2011.

GUTIÉRREZ-RODELO, Citlaly; ROURA-GUIBERNA, Adriana; ALBERTO OLIVARES-REYES, Jesus. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update. **Gaceta Médica de México**, v. 153, p. 197–209, 2017.

HA, Minju; KIM, V. Narry. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3838>>.

HATHAWAY, Quincy A et al. Regulating MicroRNA Expression: At the Heart of Diabetes Mellitus and the Mitochondrion. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, n. 304, p. ajpheart.00520.2017, 2017. Disponível em: <<http://ajpheart.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpheart.00520.2017>>.

HE, Yuqing et al. A systematic study of dysregulated MicroRNA in type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, 2017.

HESSVIK, Nina Pettersen; SANDVIG, Kirsten; LLORENTE, Alicia. Exosomal miRNAs as biomarkers for prostate cancer. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. MAR, p. 1–9, 2013.

HUANG, Weili. MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics. **Bioinformatics in MicroRNA Research, Methods in Molecular Biology**, v. 1617, p. 169–177, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7046-9>>.

HUNTLEY, Rachael P. et al. Expanding the horizons of microRNA bioinformatics. **Rna**, v. 24, n. 8, p. 1005–1017, 2018.

JIMÉNEZ-LUCENA, Rosa et al. A plasma circulating miRNAs profile predicts type 2 diabetes mellitus and prediabetes: from the CORDIOPREV study. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 50, n. 12, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0194-y>>.

KALWAT, Michael A.; COBB, Melanie H. **Mechanisms of the amplifying pathway of insulin secretion in the β cell. Pharmacology and Therapeutics**. [S.l.: s.n.], 2017

KALWAT, Michael A.; THURMOND, Debbie C. Signaling mechanisms of glucose-induced F-actin remodeling in pancreatic islet β cells. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 45, n. 8, p. e37-12, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/emm.2013.73>>.

KAMALDEN, Tengku Ain et al. Exosomal MicroRNA-15a Transfer from the Pancreas Augments Diabetic Complications by Inducing Oxidative Stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 27, n. 13, p. 913–930, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5649125/pdf/ars.2016.6844.pdf>>. Acesso em: 6 nov. 2018.

KANAT, Mustafa; DEFRONZO, Ralph A; ABDUL-GHANI, Muhammad A. Treatment of prediabetes. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 12, p. 1207, 2015.

KAROLINA, Dwi Setyowati et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 12, p. 1–6, 2012.

KAROLINA, Dwi Setyowati et al. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

KATO, Norihiro. Insights into the genetic basis of type 2 diabetes. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 4, n. 3, p. 233–244, 2013.

KLÖTING, Nora et al. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, p. 2–7, 2009.

KONG, Lei et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: A clinical study. **Acta Diabetologica**, v. 48, n. 1, p. 61–69, 2011.

KOSAKA, Nobuyoshi et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 23, p. 17442–17452, 2010.

KRHÁČ, Maja; LOVRENČIĆ, Marijana Vučić. Update on biomarkers of glycemic control. **World Journal of Diabetes**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2019.

LA SALA, Lucia et al. Circulating microRNA-21 is an early predictor of ROS-mediated damage in subjects with high risk of developing diabetes and in drug-naïve T2D. **Cardiovascular Diabetology**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12933-019-0824-2>>.

LIANG, Ying Zhi et al. Identification of neuroendocrine stress response-related circulating MicroRNAs as biomarkers for type 2 diabetes mellitus and insulin resistance. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. MAR, p. 1–11, 2018.

- LIU, Xunxian; YAO, Zemin. Chronic over-nutrition and dysregulation of GSK3 in diseases. **Nutrition and Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 1–18, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12986-016-0108-8>>.
- LONTCHI-YIMAGOU, Eric et al. Diabetes mellitus and inflammation. **Current Diabetes Reports**, v. 13, n. 3, p. 435–444, 2013.
- MAAMOUN, Hatem et al. Crosstalk Between Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in Endothelial Dysfunction and Aberrant Angiogenesis Associated With Diabetes: A Focus on the Protective Roles of Heme Oxygenase (HO)-1. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. February, p. 1–21, 2019.
- MAIESE, Kenneth. New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. v. 2015, n. Dm, p. 46–49, 2015.
- MAKAROVA, Julia A. et al. Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 51, n. 3–4, p. 33–49, 2016.
- MANNING, Brendan D; TOKER, Alex. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Physiology & behavior**, v. 169, n. 3, p. 381–405, 2018.
- MATSHA, Tandi E. et al. MicroRNA profiling and their pathways in South African individuals with prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. **Oncotarget**, v. 9, n. 55, p. 30485–30498, 2018.
- MOHR, Ashley M.; MOTT, Justin L. Overview of microRNA biology. **Seminars in Liver Disease**, v. 35, n. 1, p. 3–11, 2015.
- MOLLER, David E. Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 11, n. 6, p. 212–217, 2000.
- MORELLI, Adrian E. et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3257–3266, 2004.
- MURALIDHARAN-CHARI, Vandhana et al. Microvesicles: Mediators of extracellular communication during cancer progression. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 10, p. 1603–1611, 2010.
- NAGAISHI, Kanna et al. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic nephropathy via the paracrine effect of renal trophic factors including exosomes. **Nature Publishing Group**, 2016. Disponível em: <www.nature.com/scientificreports>. Acesso em: 6 nov. 2018.
- NIE, Hao; YI, Wen. O-GlcNAcylation, a sweet link to the pathology of diseases. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 20, n. 5, p. 437–448, 2019.
- NUNEZ LOPEZ, Yury O.; GARUFI, Gabriella; SEYHAN, Attila A. Altered levels of circulating cytokines and microRNAs in lean and obese individuals with prediabetes and type 2 diabetes. **Molecular BioSystems**, v. 13, n. 1, p. 106–121, 2017.
- PAPPACHAN, Joseph M et al. Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnostic evaluation and management. **World Journal of Diabetes**, v. 4, n. 5, p. 177, 2013. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1948-9358/full/v4/i5/177.htm>>.
- PARDO, Fabián et al. Extracellular vesicles in obesity and diabetes mellitus. **Molecular**

Aspects of Medicine, v. 60, p. 81–91, 2018.

POGRIBNY, Igor P. MicroRNAs as biomarkers for clinical studies. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 3, p. 283–290, 2018.

RAMALHO, Ana Rita et al. Hyperglycemia-induced degradation of HIF-1 α contributes to impaired response of cardiomyocytes to hypoxia. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 36, n. 5, p. 367–373, 2017.

RAPOSO, Graça; STOORVOGEL, Willem. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.

REZAIE, Jafar et al. Diabetic sera disrupted the normal exosome signaling pathway in human mesenchymal stem cells in vitro. **Cell and Tissue Research**, 2018.

ROCHETTE, Luc et al. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 9, p. 2709–2729, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.017>>.

SALTIEL, Alan R; KAHN, C Ronald. Glucose and Lipid Metabolism. **Glucose Homeostasis and Insulin Resistance**, v. 414, n. December, p. 1–21, 2012.

SANTOVITO, Donato et al. Plasma exosome MicroRNA profiling unravels a new potential modulator of adiponectin pathway in diabetes: Effect of glycemic control. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 9, p. E1681–E1685, 2014.

SCHUBBERT, Suzanne; SHANNON, Kevin; BOLLAG, Gideon. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 295–308, 2007.

SCREEN, Mark et al. Abnormal splicing of NEDD4 in myotonic dystrophy type 2: Possible link to statin adverse reactions. **American Journal of Pathology**, v. 184, n. 8, p. 2322–2332, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.04.013>>.

SETHUPATHY, Praveen. The Promise and Challenge of Therapeutic MicroRNA Silencing in Diabetes and Metabolic Diseases. **Current Diabetes Reports**, v. 16, n. 6, p. 2–7, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11892-016-0745-3>>.

SHAH, Ravi; PATEL, Tushar; FREEDMAN, Jane E. Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 10, p. 958–966, 2018. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1704286>>.

TABÁK, Adam G; HERDER, Christian; KIVIMÄKI, Mika. Prediabetes : A high-risk state for developing diabetes Progression from prediabetes to diabetes Reversion to normoglycaemia Risk prediction. **Lancet**, v. 379, n. 9833, p. 2279–2290, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3891203/>>.

TANCREDI, Mauro et al. Excess mortality among persons with type 2 diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 18, p. 1720–1732, 2015.

TEO, Chin Fe; WOLLASTON-HAYDEN, Edith E.; WELLS, Lance. Hexosamine flux, teh O-GlcNAc modification, and the Development of Insulin Resistance in Adipocytes. **National institutes of health**, v. 318, n. 2, p. 44–53, 2010.

TURCHINOVICH, Andrey; TONEVITSKY, Alexander G.; BURWINKEL, Barbara. Extracellular miRNA: A Collision of Two Paradigms. **Trends in Biochemical Sciences**, v.

41, n. 10, p. 883–892, 2016.

TURKMEN, Kultigin. Inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy in diabetes mellitus and diabetic kidney disease: the Four Horsemen of the Apocalypse. **International Urology and Nephrology**, v. 49, n. 5, p. 837–844, 2017.

TWIGG, Stephen M.; WONG, Jencia. The imperative to prevent diabetes complications: A broadening spectrum and an increasing burden despite improved outcomes. **Medical Journal of Australia**, v. 202, n. 6, p. 300–306, 2015.

VAISHYA, Suniti; SARWADE, Rucha D.; SESHADRI, Vasudevan. MicroRNA, proteins, and metabolites as novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and related complications. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. APR, p. 1–12, 2018.

VASU, Srividya et al. MicroRNA Signatures as Future Biomarkers for Diagnosis of Diabetes States. 2019.

WANG, Qiang et al. miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 8, p. 2889–2894, 2008.

WILLIAMSON, Joseph R. et al. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. **Diabetes**, v. 42, n. 6, p. 801–813, 1993.

WILSON, Mara Lynn. Prediabetes: Beyond the Borderline. **Nursing Clinics of North America**, v. 52, n. 4, p. 665–677, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. **Isbn**, v. 978, p. 88, 2016. Disponível em:
<http://www.who.int/about/licensing/%5Cnhttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf>.

WULANINGSIH, Wahyu et al. Investigating the associations between adiposity, life course overweight trajectories, and telomere length. **Aging**, v. 8, n. 11, p. 2689–2701, 2016.

XIAO, Dan et al. MicroRNA-17 impairs glucose metabolism in insulin-resistant skeletal muscle via repressing glucose transporter 4 expression. **European Journal of Pharmacology**, v. 838, p. 170–176, 2018. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.036>>.

YAN, Liang-jun. Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 1, n. 1, p. 7–13, 2018.

YANG, Seo-Yun et al. Secretagogin affects insulin secretion in pancreatic β -cells by regulating actin dynamics and focal adhesion. **Biochemical Journal**, v. 473, p. 1791–1803, 2016.

YEUNG, Frank et al. Nontelomeric Role for Rap1 in Regulating Metabolism and Protecting against Obesity. **Cell Reports**, v. 3, n. 6, p. 1847–1856, 2013.

YOON, Mee Sup. The role of mammalian target of rapamycin (mTOR) in insulin signaling. **Nutrients**, v. 9, n. 11, 2017.

YOON, Yae Jin; KIM, Oh Youn; GHO, Yong Song. Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. **BMB Reports**, v. 47, n. 10, p. 531–539, 2014.

YUANA, Yuana; STURK, Auguste; NIEUWLAND, Rienk. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. **Blood Reviews**, v. 27, n. 1, p. 31–39, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2012.12.002>>.

ZHANG, Yurong et al. A novel testing model for opportunistic screening of pre-diabetes and diabetes among U.S. adults. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–14, 2015.

ZHOU, Tong et al. Regulation of insulin resistance by multiple MiRNAs via targeting the GLUT4 signalling pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 2063–2078, 2016.

ANEXO 1

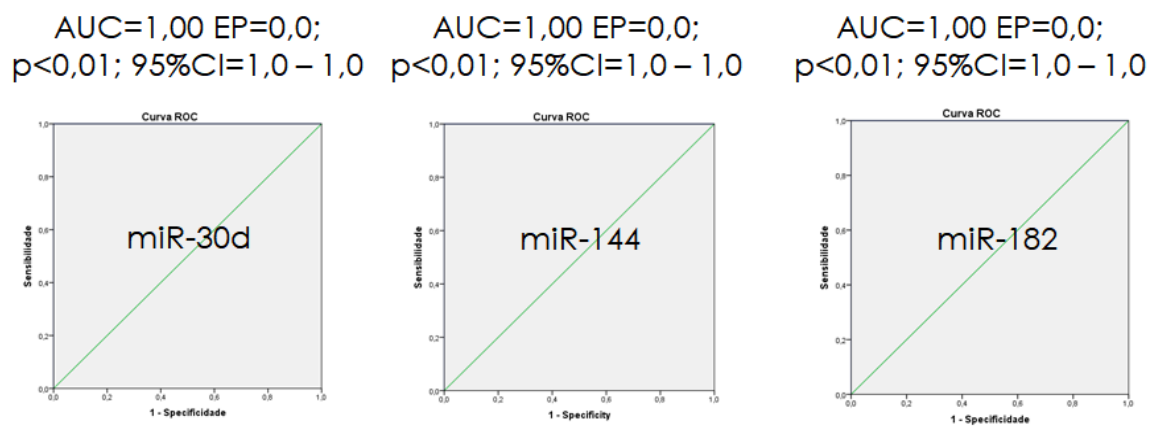


Figura: Área sob a curva dos miRNA que apresentaram maior sensibilidade e especificidade para o estado de pré-diabetes, mas que foram excluídos do perfil pela análise de centralidade

ANEXO 2

FICHA CATALOGRÁFICA

N513 Neves, Victor de Barros Serrano.
MicroRNA como biomarcadores para identificação de indivíduos com pré-diabetes e diagnóstico precoce do diabetes/Victor de Barros Serrano Neves. – Salvador, 2020.
64f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Garcia Macambira; Co-orientadora: Profa. Dra. Natália Machado Tavares.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2020.

Inclui referências e anexos.

1. Diabetes. 2. Mecanismos moleculares. 3. Expressão gênica.
4. Transcriptoma – Bahia – Brasil. I. Universidade Federal da Bahia.
II. Título

CDU 616.379-008.64