

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO.
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA.**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM
CÉLULAS BETA SECRETORAS DE INSULINA SUBMETIDAS A
ALTA GLICOSE E PALMITATO.**

Rodrigo Henrique Ferreira Costa

Dissertação apresentada
à Universidade Federal de
São Paulo – Campus São
Paulo, para obtenção do
título de Mestre em
Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Aparecida Emiko Hirata.
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Rebelato Lopes de Oliveira

São Paulo
2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Henrique Ferreira Costa, Rodrigo

Avaliação do perfil de expressão de microRNAs em células beta secretoras de insulina submetidas a alta glicose e palmitato / Rodrigo Henrique Ferreira Costa. - São Paulo, 2022.

X, 80f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Título em inglês: Evaluation of the expression profile of microRNAs that regulate the functions of insulin-secreting beta cells subjected to high glucose and palmitate.

1. Diabetes Mellitus tipo 2. 2. células beta pancreáticas. 3. microRNAs. 4. Estado redox. 5. Avaliação do perfil de expressão gênica de microRNAs.

IDENTIFICAÇÃO DA BANCA

Rodrigo Henrique Ferreira Costa

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM CÉLULAS BETA SECRETORAS DE INSULINA SUBMETIDAS A ALTA GLICOSE E PALMITATO.

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do título de mestre.

Dr. Manoel de Arcisio Miranda

Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Prof. Dr. Fernando A. Oliveira

Universidade Federal do ABC – UFABC

Prof. Dr. Fernando Rodrigo de Moraes Abdulkader

Universidade de São Paulo – USP

Prof^a. Dra. Eliana Hiromi Akamine - Suplente

Universidade de São Paulo - USP

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus por ter me ajudado a chegar até aqui, por ter me dado forças para continuar e não desistir. A Ele, o autor da vida, seja dado toda honra, glória e louvor!

Quero prestar meu agradecimento a minha orientadora Prof.^a Dra. Aparecida Emiko Hirata pela oportunidade de realizar esse trabalho e por todos os seus ensinamentos que contribuíram para o meu desenvolvimento.

Ao Prof. Dr. Eduardo Rebelato Lopes de Oliveira pelo apoio e co-orientação desse projeto.

Agradeço também à Dra. Larissa Valdemarin Bim pela colaboração e dedicação por esse trabalho.

À Prof.^a Dra. Janete Maria Cerurti, diretora do Laboratório as Bases Genéticas dos Tumores da Tireoide e Prof.^a Dra. Katia de Angelis do Departamento de Fisiologia Da Unifesp por ter aberto às portas do seu laboratório e auxílio na realização desse estudo.

À Universidade Federal de São Paulo por acolher e permitir fazer parte dessa casa do saber e por toda a infraestrutura e funcionários que mantêm tudo em funcionamento.

Ao pessoal do laboratório, Ana e Beatriz, pela ajuda. Espero ter contribuído também de alguma forma a vocês.

À Agência de Fomento Capes pela provisão da bolsa e recursos para realização da pesquisa.

Por fim, a minha esposa, a melhor companheira que eu poderia ter, Roberta Quintino Silva. Por apoiar todo esse tempo mesmo nas dificuldades, esteve do meu lado.

Muito obrigado a todos!

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica metabólica de etiologia múltipla que ocorre tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. No Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), a resistência insulina e/ou falha na secreção do hormônio podem levar a distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. A hiperglicemia crônica associada a dislipidemia no DM2 é capaz de prejudicar funções importantes nas células beta secretoras de insulina. Uma condição que tem sido bem descrita no DM2 é o estresse oxidativo, que está envolvido na patogênese da doença e pode ser observado principalmente nos tecidos alvo da insulina e nas células beta pancreáticas. A sinalização da insulina nesses tecidos e o processo secretório do hormônio pelas células beta são prejudicados por essa condição. Desordens metabólicas presentes no DM2 como a hiperglicemia e a dislipidemia são as principais responsáveis por desencadear o estresse oxidativo. Diversos estudos apontam que os miRNAs apresentam diferentes influências nas células beta pancreáticas, como na função, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular e estão alterados no DM. De acordo com os nossos resultados, os microRNAs miR-15b, miR-132, miR-184, miR-195 e o miR-204, relacionados a proliferação e desenvolvimento das células beta, tiveram uma alteração significativa na expressão nas células beta pancreáticas submetidas a alta glicose e ácido graxo (24h) em relação ao controle. Em relação aos microRNAs envolvidos na biossíntese da insulina, o miR-204, miR-26 35% e o miR-182 tiveram uma redução significativa de expressão após tratamento com alta glicose e ácido graxo. Os miR-9, miR-184, miR130a e o miR-212, miR-132, o miR-29a, o miR-152, miR-130b e o miR-96, envolvidos na regulação da secreção de insulina, tiveram suas expressões alteradas nas células tratadas com alta glicose e ácido graxo. Além disso, o tratamento com a alta glicose e ácido graxo levou a um aumento significativo de conteúdo de EROs, porém a uma redução significativa do radical anion superóxido. Desta forma, foi observado que a exposição aguda a alta glicose e ácido graxo é capaz de modular miRNAs, que regulam funções importantes na célula e podem estar envolvidos no estado redox.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a chronic metabolic disease of multiple etiology that occurs in both developed and developing countries. In Type 2 Diabetes Mellitus (DM2), insulin resistance and/or failure to secrete the hormone can lead to disturbances in carbohydrate, fat, and protein metabolism. Chronic hyperglycemia associated with dyslipidemia in DM2 is capable of impairing important functions in insulin-secreting beta cells. A condition that has been well described in T2DM is oxidative stress, which is involved in the pathogenesis of the disease and can be observed mainly in insulin target tissues and pancreatic beta cells. Insulin signaling in these tissues and the secretion process of the hormone by beta cells are impaired by this condition. Metabolic disorders present in DM2 such as hyperglycemia and dyslipidemia are the main ones responsible for triggering oxidative stress. Several studies indicate that miRNAs have different influences on pancreatic beta cells, such as cell function, differentiation, proliferation, and survival, and are altered in DM. According to our results, miR-15b, miR-132, miR-184, miR-195, and miR-204 microRNAs, related to the proliferation and development of beta cells, had a significant change in expression in pancreatic beta cells submitted to the high glucose and fatty acid (24h) about the control. Regarding the microRNAs involved in insulin biosynthesis, miR-204 (-54%), miR-26 (-35%), and miR-182 (-95%) had a significant reduction in expression after treatment with high glucose and fatty acid. miR-9, miR-184, miR130a and miR-212, miR-132, miR-29a, miR-152, miR-130b, and miR-96, involved in the regulation of insulin secretion, had their expressions altered in cells treated with high glucose and fatty acid. Furthermore, treatment with high glucose and fatty acid led to a significant increase in ROS content, but a significant reduction in superoxide. Thus, it was observed that acute exposure to high glucose and fatty acid can modulate miRNAs that regulate important functions in the cell and may be involved in the redox state.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biossíntese da insulina.....	13
Figura 2: Mecanismo de secreção de insulina.....	15
Figura 3: Biogênese e secreção dos microRNAs.....	20
Figura 4. Análise de conteúdo de EROs.....	33
Figura 5: miRNAs na células beta pancreáticas.....	33
Figura 6: miRNAs envolvidos na proliferação celular e desenvolvimento.....	35
Figura 7: miRNAs envolvidos na biossíntese da insulina.....	36
Figura 8: miRNAs envolvidos na secreção da insulina.....	38
Figura S1: Eletroforose das amostras	68
Figura S2: Curva de amplificação do primeiro experimento.....	69
Figura S3: Curva de amplificação do segundo experimento.....	70
Figura S4: Curva de amplificação do terceiro experimento.....	71
Figura S5: Curva de amplificação do quarto experimento.....	75
Figura S6: Curva de amplificação do quinto experimento.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise de conteúdo de EROS.....	32
Tabela 2: Valores estáticos de expressão dos miRNAs.....	34
Tabela 3: Valores de diferença de expressão de miRNAs envolvidos na proliferação e desenvolvimento celular.....	35
Tabela 4: Valores de diferença de expressão de miRNAs envolvidos na biossíntese da insulina.....	37
Tabela 5: Valores de diferença de expressão de miRNAs envolvidos na secreção da insulina.....	38
Tabela S1: Teste de Normalidade – Shapiro Wilk.....	64
Tabela S2: Valores estáticos do miRNA do teste- T e de Main Whitney.....	66
Tabela S4-S8: Tabelas de amplificação do Array dos miRNAs.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: adenilato ciclase

ADA: Associação Americana de Diabetes

ADP: adenosina difosfato

AGO: proteínas argonautas

ATP: adenosina trifosfato

CAMP: monofosfato cíclico de adenosina

CAT: catalase

CDNA: DNA complementar

CT: Ciclo do *Threshold*

DAG: Diacilglicerol

DCFH: Dichlorodihydrofluorescein

DHE: dihydroethidium

DM: Diabetes Mellitus

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

DMG: Diabetes Mellitus Gestacional

DNA: ácido desoxirribonucleico

ERO: Espécie Reativa de Oxigênio

FADH: flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂)

G6P: Glicose-6-fosfato

GLUT: transportador de glicose

GPx: glutationa peroxidase

HPL: lactogênio placentário humano

IP3: 4,4,5 inositol-trifosfato

IRS: substrato de Receptor de insulina

K_m: constante de Michaelis-menten

MAPK: Proteínas quinases ativadas por mitógeno

MDA: malondialdeído

miR: microRNA

miRNA: microRNA: micro ácido ribonucleico

MODY: Início de Diabetes de Jovens na Maturidade

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH-oxidase: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NOD: ratos diabéticos não obesos

PCR-RT: Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase

PIP2: Fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato

PKA: proteína quinase A

PKC: proteína quinase C

PLC: fosfolipase C

RER: Retículo Endoplasmático Rugoso

RISC: Complexo de silenciamento induzido por RNA

RNA: Ácido Ribonucleico

RNAm: ácido ribonucleico mensageiro

rRna: Ácido ribonucleico ribossômico

SBD: Sociedade Brasileira de Diabetes

SIEG: Secreção de insulina estimulada por glicose

SIRT: Sirtuínas

SOD: superóxido dismutase

UTR: *região não codificantes*

VE: Vesículas extracelulares.

SUMÁRIO

Resumo.....	v
Lista de Figuras e Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	viii
1. Introdução.....	11
1.1 Homeostasia glicêmica.....	11
1.2 Insulina – síntese e secreção.....	12
1.3 MicroRNAs e as células beta pancreáticas.....	16
1.5 MicroRna – Biogênese.....	18
1.6 Regulação da expressão gênica por MicroRNAs.....	20
1.7 Diabetes Mellitus.....	22
1.4 Estresse oxidativo no Diabetes.....	24
2. Justificativa	28
3. Objetivos	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivo específico.....	29
4. Métodos.....	29
4.1 Cultura de células.....	29
4.3 Avaliação do conteúdo de EROs por citometria de fluxo.....	30
4.2 Quantificação da expressão de microRNAs por RT-PCR.....	30
4.4 Eletroforese em Gel de RNA total.....	31
4.5 Análise estatística.....	31
5. Resultados	32
6. Discussão	39
7. Conclusão	48
8. Referências	50
9. Suplementar.....	64

1. Introdução

1.1 Homeostasia glicêmica

A porção endócrina do pâncreas é constituída por um aglomerado de células, que formam as ilhotas de Langerhans. Dois hormônios sintetizados nesse tecido são essenciais para a homeostasia da glicose: a insulina, produzida pelas células beta, e o glucagon, pelas células alfa. No fígado, o glucagon promove a degradação do glicogênio (glicogenólise) de modo aumentar a concentração de glicose. Enquanto a insulina estimula a captação de glicose nos tecidos periféricos e a síntese de glicogênio no fígado e nos músculos. Além disso, é considerada um hormônio anabolizante que exerce sua ação no armazenamento de substâncias energéticas, no crescimento e diferenciação celular (Roder et al., 2016).

A glicose é o principal carboidrato utilizado como fonte de energia para os diversos tecidos do organismo. As células conseguem suprir sua carência energética a partir desse açúcar e as que são fortemente dependentes desse glicídio, como os neurônios e as hemácias (Shepherd, Kahn, 1999). Mecanismos fisiológicos complexos operam no intuito de ajustar e manter a glicemia dentro de níveis fisiológicos. Isso porque se um desequilíbrio na concentração de glicose persistir no sangue pode resultar em efeitos prejudiciais, como disfunção e até mesmo falência de diversos órgãos (Robertson et al., 2006).

Durante o jejum, a homeostasia da glicose é um processo resultante da regulação da produção de glicose hepática promovida pelo glucagon e sua utilização pelos tecidos, principalmente, os mais dependentes deste carboidrato. Assim, a glicose se torna disponível no sangue de modo manter a normoglicemia, preservando as funções vitais do organismo. Após as refeições, quando os níveis glicêmicos aumentam, a insulina mobiliza a glicose para os tecidos musculares e adiposos. Quando a síntese de glicogênio atinge seu limite, a glicose resultante será convertida em gordura pela ação da insulina e armazenada no tecido adiposo (Petersen, 2017).

Nos tecidos alvo, a insulina pode se ligar a um receptor de membrana do tipo tirosina-quinase específico. O receptor da insulina é uma proteína heterotetramérica composto por duas subunidades alfa (extracelulares) e duas subunidades beta. A subunidade beta do receptor de insulina se comporta como uma enzima alostérica com a sua atividade inibida pela subunidade alfa, quando o receptor

não está ligado à insulina. Ao ser ativado pelo hormônio, o receptor de insulina sofre uma alteração conformacional na subunidade alfa, o que permite a atividade quinase da subunidade beta e, subsequente, autofosforilação. Dessa forma, o receptor de insulina é capaz de fosforilar seus substratos proteicos em tirosina, dentre os quais pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, como as proteínas IRS (substrato de receptor de insulina). Devido à fosforilação em resíduos de tirosina, as proteínas IRS criam sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios homólogos à Src2 ou SH2, como a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K). Dessa forma, a insulina ativa diversas vias metabólicas de modo a produzir efeitos sobre o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. A sinalização da insulina promove a captação de glicose através da translocação dos transportadores de glicose tipo 4 (GLUT4) para membrana celular nos tecidos periféricos, principalmente o tecido adiposo e muscular (Boron, 2015; Hall, Guyton, 2016).

Além de ser fosforilado em resíduos de tirosina, o receptor de insulina também pode ser fosforilado em serina, porém isso resulta em atenuação da transmissão do sinal do hormônio. Tal efeito se deve a redução da capacidade do receptor de se fosforilar em tirosina, após a ligação da insulina. Esse mecanismo inibitório está relacionado ao feedback negativo na sinalização insulínica e também na gênese da resistência à insulina (Copps et al., 2012). A ação deste hormônio não se restringe apenas à homeostasia glicêmica, mas também abrange uma ampla gama de eventos celulares como a regulação do transporte de íons e aminoácidos, metabolismo lipídico, transcrição gênica e no estímulo dos processos de transdução do RNA mensageiro (RNAm) e síntese de DNA. No metabolismo de proteínas, a insulina inibe o catabolismo proteico e estimula a captação e conversão de aminoácidos nas células (Cheatham, Kahn, 1995; Petersen 2018).

1.2 Insulina - síntese e secreção

A insulina é uma proteína composta por 51 aminoácidos que é sintetizada e secretada pelas células beta pancreáticas. Inicialmente, a insulina é codificada nos ribossomos em pré-proinsulina. Estruturalmente, a pré-proinsulina é formada em quatro porções peptídicas específicas: as cadeias A, B, C e o peptídeo sinalizador. Após a sua síntese, a pré-proinsulina é transportada para o retículo endoplasmático rugoso (RER) através do canal condutor de peptídeo na membrana. Nessa etapa, o peptídeo sinalizador é removido pela peptidase sinalizadora e forma a proinsulina.

Assim, as três cadeias peptídicas resultantes dessa molécula são: a A, B e C (Fu et al., 2013; Boron, 2015).

No RER, a proinsulina é dobrada e recebe três ligações de dissulfeto, gerando uma conformação tridimensional. Na sequência, a proinsulina é transportada do RER para o complexo de Golgi, onde é armazenada em vesículas imaturas. Então, essa molécula é clivada em dois locais, dando origem a insulina e o peptídeo C, armazenados em grânulos secretórios com outros produtos secretórios das células beta. Dessa forma, a insulina consistirá em uma estrutura monomérica composta pela cadeia peptídica A com 30 aminoácidos e pela cadeia B com 21 aminoácidos, as quais estão ligadas por duas pontes de dissulfeto. (Fu et al., 2013; Liu et al., 2018; Tokar et al., 2018) (Figura 1).

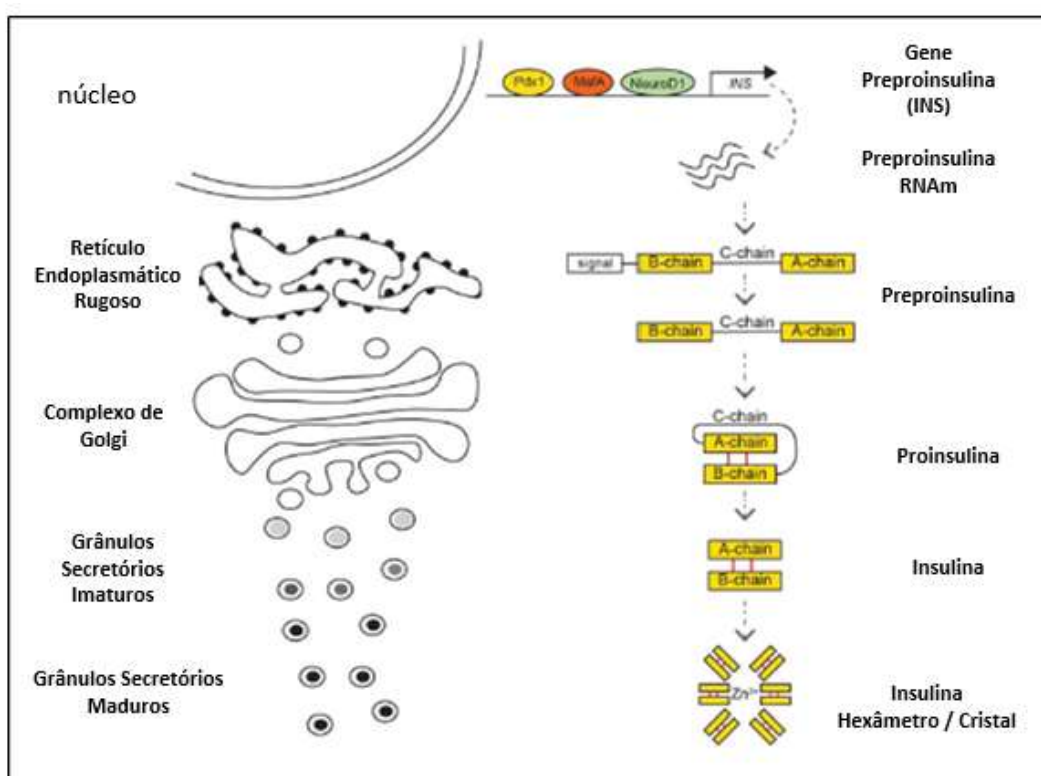


Figura 1: Biossíntese da insulina: inicialmente, a insulina é expressa na forma peptídica pré-proinsulina, sendo, após, transportada para o retículo endoplasmático rugoso (RER). Em seguida, esse peptídeo é processado na forma de proinsulina. No complexo de Golgi será armazenada em vesículas imaturas, e clivada para originar a insulina. Adaptado de Tokar et al., 2018.

Diversos fatores controlam a biossíntese da insulina, sendo o metabolismo da glicose o principal fator fisiológico regulatório que estimula a transcrição gênica do hormônio. As etapas da expressão gênica da insulina, incluindo a transcrição, o

splicing do pré-RNA e a estabilização do RNAm são controladas pela glicose (Poitout et al., 2006). Contudo, estudos demonstraram que um nível elevado de glicose por um período longo é capaz de prejudicar a biossíntese da insulina e vários fatores estão relacionados, como decréscimo de fatores de transcrição e do RNAm da insulina, estresse do retículo endoplasmático e entre outros (Poitout et al., 2006; Kim et al., 2012).

A glicose também é considerada como o principal secretagogo de insulina pelas células beta pancreáticas. Não apenas a glicose, mas diversos nutrientes, incluindo outros carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, além de neurotransmissores e hormônios peptídicos, os quais também podem modular a secreção de insulina. A passagem da glicose para o meio intracelular ocorre por transportadores de glicose (GLUT), através de difusão facilitada. A captação de glicose pelas células beta pancreáticas ocorre pelo transportador do tipo 2 (GLUT-2), constitutivamente expresso na membrana, sendo considerado um sensor de glicose para a célula. Após a sua admissão, a glicose é fosforilada em glicose-6-fosfato (G-6-P) pela ação de duas enzimas: a hexoquinase I de alta afinidade ($K_m < 0,1$ mmol/l) e principalmente pela hexoquinase IV (glicoquinase) de baixa afinidade (K_m entre 6-11 mmol/L). Devido a sua capacidade de alterar o fluxo glicolítico, a glicoquinase tem um papel importante na regulação da secreção de insulina. Além disso, devido a sua baixa afinidade pelo substrato, a glicoquinase fosforila a glicose segundo as variações glicêmicas. Sendo assim, essa enzima é também reportada como um sensor de glicose (Fu et al., 2013).

Após a glicose ser fosforilada (G-6-P), segue preferencialmente para via da glicólise, onde é convertida em piruvato. No citoplasma, o piruvato é transferido para a mitocôndria, onde será metabolizado pela piruvato desidrogenase em acetil-CoA. Em seguida, a acetil-CoA entra no ciclo de Krebs, resultando em um aumento na produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂). Na cadeia respiratória, o NADH e FADH₂ serão oxidados para gerar mais ATP. Dessa forma, esses processos aumentarão a razão de ATP/ADP no citoplasma, levando ao fechamento dos canais para potássio (K⁺) sensíveis ao ATP (K_{ATP}). Com o fechamento desses canais ocorre uma redução o efluxo de K⁺, resultando na retenção de cargas positivas no meio intracelular, o que leva à alteração do potencial elétrico da membrana plasmática e, conseqüentemente, na sua despolarização. Desse modo, os canais para Ca₂⁺ do tipo L, sensíveis à voltagem se

abrem, permitindo o influxo de cálcio (Ca^{2+}), levando a ativação da máquina secretória e, assim, a exocitose dos grânulos de insulina (Haber et al., 2001) (Figura 2).

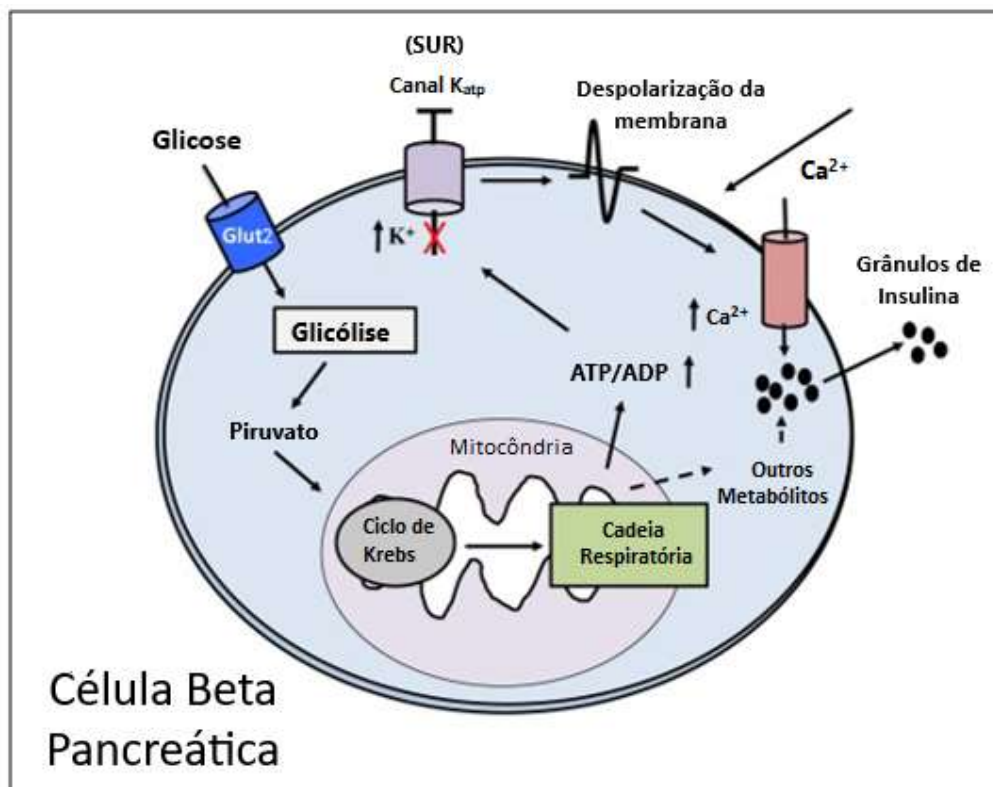


Figura 2: Mecanismo de secreção de insulina por estímulo de glicose (SIEG): Admissão da glicose pelos transportadores GLUT2, metabolismo da glicose, aumento da razão ATP/ADP, fechamento dos canais KATP, despolarização, abertura dos canais para cálcio e exocitose de grânulos de insulina. Adaptado de Marchetti et al., 2017.

Além disso, a entrada de Ca^{2+} na célula, através dos canais a cálcio voltagem dependente do tipo L, leva a ativação de segundo mensageiros como a fosfolipase C (PLC) e proteína quinase C (PKC). A PLC, quando ativada, hidrolisa fosfolípidos de membrana (PIP2) e gera o diacilglicerol (DAG) e 4,4,5 inositol-trifosfato (IP3). No retículo endoplasmático, o IP3 promove a liberação de Ca^{2+} no citosol, ao ativar os canais de cálcio localizados na membrana da organela, reforçando o aumento da concentração intracelular do íon. O DAG e o cálcio são capazes de ativar a proteína quinase C (PKC), uma enzima que participa da secreção de insulina através da fosforilação de proteínas envolvidas na exocitose (Zawalich et al., 1996; Yamazaki et al., 2010).

1.3 MicroRNAs e as células beta pancreáticas

Nos últimos anos, já foram descritos diversos microRNAs (miRNAs) que participam em funções importantes das células beta pancreáticas como no desenvolvimento celular, regulação da síntese e secreção de insulina e entre outros processos. Nas ilhotas pancreáticas, o primeiro miRNA descoberto foi o miR-375 e está envolvido na homeostasia da glicose. A partir dessa descoberta, outros miRNAs foram identificados com funções importantes nas células beta pancreáticas (Dumortier et al., 2012; Guay et al., 2012). Estudos apontaram que o miR-375 desempenha um papel importante no desenvolvimento das ilhotas (Li et al., 2014) e é responsável por regular negativamente a expressão de genes envolvidos na secreção estimulada pela glicose (SIEG) (Poy et al., 2004). Além disso, foi demonstrado que a deleção do miR-375 resulta na perda da capacidade compensatória das ilhotas de modelos de animais DM2 na resistência insulínica (Poy et al., 2009).

Em ilhotas pancreáticas de modelos de camundongos pré-diabéticos NOD (diabéticos não obesos), os miR-21 e miR-29a/b apresentam-se aumentados e tal condição mostrou interferir negativamente na secreção do hormônio (Roggli et al., 2010; Roggli et al., 2012). O miR-9 (Plaisance et al., 2006) e o miR-96 (Lovis et al., 2008) interferem negativamente na secreção de insulina por modular positivamente a expressão de granufilina de forma indireta. Outros microRNAs envolvidos na regulação da secreção de insulina é o miR-218 e o miR-322. Esses miRNAs foram encontrados aumentados em ilhotas expostas à alta glicose e, conseqüentemente, foi observado a diminuição da secreção de insulina via regulação negativa da *Stxbp1* (Lang et al., 2015).

O miR-7a é altamente expresso no pâncreas endócrino de humanos e roedores e possui uma ação regulatória negativa na secreção do hormônio. Além disso, esse miRNA está envolvido na regulação negativa da diferenciação e proliferação das células beta (Bravo-Egana et al., 2008; Latreille et al., 2014). O miR-152 e miR-187 são expressos em células beta e também estão envolvidos na regulação da secreção de insulina. Foi demonstrado que a superexpressão desses miRNAs reduziu a SIEG, contudo sem alterar o conteúdo de insulina (Alejandro et al., 2014; Locke et al., 2014). Estudos mostraram que o miR-24, miR-26 e o miR-182 estão associados a regulação positiva do conteúdo de insulina nas células beta por modularem negativamente

fatores de transcrição, que reprimem a transcrição do gene da insulina (Melkman-Zehavi et al., 2011).

O miR-184 está envolvido na regulação da secreção de insulina e proliferação das células beta, via regulação do Ago2, uma proteína que faz parte do complexo RISC (Bolmeson et al., 2011). Em modelos de animais DM2, o miR-184 tem sua expressão reduzida, sendo demonstrado que essa condição está relacionada a expansão da massa celular das células beta pancreáticas como resposta compensatória a resistência insulínica. O aumento da expressão do miR-132 encontrado em modelos de animais DM2 foi correlacionada com o aumento da proliferação das células beta pancreáticas (Nesca et al., 2013). Além disso, um outro estudo demonstrou que o aumento da expressão do miR-132 e do miR-212 levam ao aumento da secreção de insulina através da regulação da carnitina-acilcarnitina translocase (CACT) (Soni et al., 2014).

Foi reportado que o miR-195, miR-15b e o miR-16 têm como alvo o Ngn3, uma proteína envolvida no desenvolvimento e diferenciação das células beta pancreáticas (Joglekar et al., 2007). Sendo bem expresso nas células beta, o miR-204 foi apontando estar envolvido no controle da produção de insulina através da regulação do fator de transcrição de insulina MafA (Xu et al., 2013). Além disso, outros estudos mostraram a relação do miR-335 na modulação negativa da exocitose de insulina induzida por admissão de Ca⁺ e dos miR-130a/b na regulação negativa de ATP/ADP em células beta pancreáticas (Salunkhe et al. 2015; Ofori et al., 2017).

Conforme um estudo realizado por Shen et al., (2022), o miR-25 atua na regulação negativa da biossíntese de insulina em células beta pancreáticas (Shen et al., 2022). O miR-338 foi associado a resposta compensatória das células beta na obesidade e gravidez e mostrou exercer um controle negativo na proliferação da célula (Jacovetti et al., 2012). Ambos miRNAs mostraram estar envolvidos no processo de apoptose induzida por citocinas pró-inflamatórias (Shen et al., 2022; Jacovetti et al., 2012).

Da família dos miR-30, o miR-30a exerce um controle negativo na secreção, expressão e conteúdo de insulina das células beta pancreáticas via inibição da expressão Beta2 e Neuro D1 (Kim et al., 2013). O miR-30b demonstrou intermediar a disfunções das células beta como a redução do conteúdo e da expressão do gene

de insulina e como de apoptose induzida por citocina pró-inflamatória (Zheng et al., 2015). Outro membro da família do miR-30, o miR-30d tem como função regular positivamente a expressão do gene da insulina em células beta pancreáticas de ilhotas de camundongos. (Tang et al., 2009; Zhao et al., 2012). O miR-483 também foi identificado nas células beta pancreáticas e regula positivamente a secreção de insulina (Mohan et al., 2015). Em células beta pancreáticas de modelos NOD foi identificado um aumento de níveis de miRNA 142-3p, o qual foi associado ao processo de ativação de apoptose das células beta, sugerindo o seu envolvimento no desenvolvimento do DM (Guay et al., 2019).

1.4 MicroRna - Biogênese

O miRNA faz parte das classes de RNAs não codificantes e constituído por uma fita simples de uma curta sequência de 21-24 nucleotídeos. Diferente do RNAm, que é expresso em proteínas, o papel do miRNA é regular a transcrição gênica de forma obter o silenciamento gênico através da repressão do RNAm-alvo. Esses reguladores transcricionais foram identificados, inicialmente, no gene LIN-4 da *Caenorhabditis elegans*. Foi notado que o gene não era codificado em proteínas, mas que o transcrito de RNA regulava negativamente a transcrição de LIN-14, ao se ligar na região 3' UTR (região não traduzida) da molécula. A partir desse achado, novos miRNAs foram descobertos em diversas espécies, assim como seu mecanismo e suas funções em vários processos biológicos e patológicos. Estima-se que mais da metade de todos os RNAm codificados no genoma humano são alvos de miRNAs (Sharp, 2009; Lee et al., 1993).

As regiões gênicas que expressam o miRNA se mostram conservadas evolutivamente entre as espécies e localizadas nos introns, que codificam transcritos não codificadores ou codificadores. Porém, alguns miRNAs são transcritos em regiões exônicas codificadoras e regiões intergênicas. Os miRNAs são expressos pela RNA polimerase II ou III na forma imatura denominada miRNA primário (pri-miRNA). A sua estrutura possui uma haste dupla fita e um loop terminal, dando um aspecto de um grampo (hairpin) a molécula, que contém na sua extremidade 5' a cap 7-metil guanosina e na região 3' uma cauda poliadenilada (poli-A). Após sua síntese, os pri-miRNAs são processados no núcleo da célula por um complexo ribonuclear formado pela ribonuclease III Drosha e seu cofator DGCR8. Durante esse processo, a Drosha remove ~11 pares de base (bp) da junção basal (sequências flanqueadoras), e 22 bp

da região apical (terminal loop), entre a dupla fita do pri-miRNA, originando os pre-miRNAs em forma de grampo novamente com aproximadamente 70-100 nucleotídeos. Em seguida, esses pré-miRNAs são transportados para o citoplasma via RanGTP Exportina-5 - um complexo proteico nuclear ligado ao GTP, que transloca o miRNA por um poro nuclear. Quando o miRNA é transportado, ocorre a hidrólise do GTP, o que resulta na dissociação do complexo de modo que o miRNA é liberado no citoplasma (Moreno-Moya et al., 2014; Ha, Kim, 2014).

A próxima etapa é a maturação da molécula, a qual será clivada pela endoribonuclease Dicer e formar uma dupla fita de miRNA imperfeita de ~ 22 pb (miRNA/miRNA*), que consiste em uma fita passageira (miRNA*) e outra fita guia (miRNA). Ainda imatura, a dupla fita de miRNA será incorporada às proteínas Argonautas Ago (1-4) e gera um complexo efetor chamado RISC (RNA-induced silencing complex). Ao se incorporar ao RISC, apenas uma das fitas permanecerá ligada ao complexo devido sua associação ser mais estável nesta forma. Isso faz com que a fita passageira seja desenrolada da proteína efetora AGO, sem gasto de ATP, e, posteriormente, podendo ser degradada. Em alguns casos, a fita passageira pode ser incorporada ao complexo RISC e se tornar funcional, porém menos potente que a fita guia de miRNA. Por fim, após a remoção da fita passageira, a fita guia do miRNA se constituirá na forma do miRNA maduro. Assim, o miRNA pode realizar a sua ação, ao orientar o complexo RISC para as sequências complementares da região 3' UTR dos RNAm alvos, levando à repressão da transcrição génica. Essa via é considerada a principal via de biossíntese de miRNAs (via canônica), porém outras vias alternativas de síntese já têm sido descritas (via não-canônica) (Bartel, 2004; Lee et al., 2006).

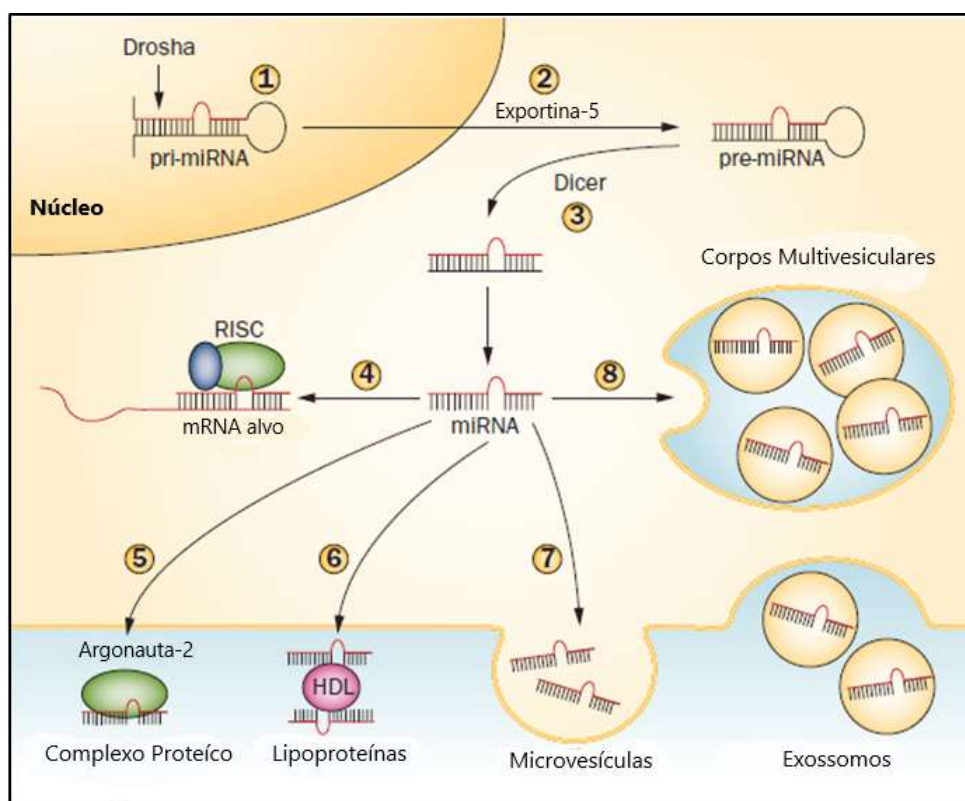


Figura 3: Biogênese e secreção dos miRNAs: (1) Processamento do pri-miRNA pela ribonuclease Drosha; (2) em seguida são transportados para o citoplasma via RanGTP Exportina-5 e (3) clivada pela endorribonuclease Dicer. Será incorporado ao complexo RISC (4) e, assim, se tornará um miRNA maduro, podendo ser secretado ou não (5). Além disso, o pri-miRNA é capaz de ser secretado através de microvesículas (7), exossomas(8) ou associados às lipoproteínas (6) (Guay, Regazzi , 2013).

Os miRNAs maduros, além de serem incorporados ao RISC, podem ser secretados e se tornarem circulantes. Nesse caso, essas moléculas podem se ligar às proteínas, como a Argonata 2 ou às lipoproteínas e, posteriormente, serem secretadas para o meio extracelular. Além disso, os miRNAs podem ser liberados em exossomas por exocitose, em microvesículas formadas por um fenômeno chamado "*plasma membrane blebbing*", ou em corpos apoptóticos (Guay, Regazzi, 2013; Boon, Vickers, 2013) (Figura 3).

1.5 Regulação da expressão gênica por microRNAs.

Recentes estudos têm demonstrado que um único miRNA é diretamente responsável pela repressão de centenas de proteínas. Por outro lado, uma única região 3' UTR do RNAm pode ser regulada por diversos miRNAs. Em humanos, aproximadamente 60% dos genes codificadores, assim como a maioria dos genes de

mamíferos, contêm pelo menos um sítio de ligação de miRNA conservado. Considerando o alto número de sítios não conservados existentes, estima-se que a maioria dos genes codificadores podem estar sob regulação dos miRNAs. Assim, os miRNAs são considerados reguladores e moduladores da expressão gênica (Moreno-Moya et al., 2014; Ha, Kim, 2014).

A região do miRNA responsável pelo pareamento “*Watson-Crick*” com as bases do RNAm é denominada como região *seed* ou semente e está localizada na extremidade 5' da molécula. A região semente do miRNA compreende as sequências complementares 2-7 de nucleotídeos e confere ao miRNA a capacidade de reconhecimento e afinidade pela molécula alvo a fim de silenciar o gene (Ha, Kim, 2014; Lee et al., 2006). Da mesma forma, os nucleotídeos a jusante também contribuem para o pareamento com as bases dos seus alvos, porém são menos potentes que a região 5' do miRNA (Ha, Kim, 2014; Bartel et al., 2009).

Embora haja recentes avanços, o mecanismo de ação pelo qual o complexo RISC e os pequenos RNAs não codificantes (siRNA e miRNA) regulam a expressão gênica tem sido motivo de grandes debates. As duas maneiras descritas pelas quais ocorrem a regulação da expressão gênica pelo complexo miRNA-RISC (miRISC) são: a repressão translacional e/ou degradação do RNAm, levando à redução dos níveis de proteína. Esses mecanismos podem variar conforme o tipo de célula ou pela estabilidade e configuração do pareamento miRISC-RNAm (Carthew et al., 2009; Jackson, 2007).

O miRNA funciona como adaptador para o miRISC especificamente reconhecer e regular RNA mensageiros através do pareamento da região semente com o seu alvo (Carthew et al., 2009; Berg et al., 2008). Um fator determinante na regulação da expressão gênica pelos miRNAs é o grau de complementaridade com o RNAm alvo. Quando o grau de complementaridade é perfeito, isso permite a clivagem das fitas de miRNA, enquanto a complementaridade incompleta, principalmente devido à incompatibilidade na região central da ligação, promove a repressão translacional do RNAm (Jackson, Standart, 2007; Boon, Vickers, 2013). Contudo, alguns estudos apontam como próprio o mecanismo de repressão translacional do complexo miRISC e que a perfeita complementaridade apenas ativa a degradação de RNAm de forma complementar (Jackson, Standart, 2007).

Outra questão determinante para regulação da expressão gênica é a característica da proteína argonauta (Ago), que define as variáveis formas de RISC. Por exemplo, as proteínas Ago 2 (presentes em humanos) do complexo miRISC é capaz de clivar RNAs, porém é necessária uma perfeita complementaridade para isso. Uma importante descoberta mostrou que o domínio PIWI das proteínas argonautas adota uma dobra semelhante à RNase H. Por essa razão, conseguem catalisar a clivagem endonucleolítica (processo dependente de fita guia) de um alvo pareado. Isso representa uma das primeiras etapas do silenciamento de RNA e posterior desestabilização da molécula (Carthew et al., 2009, Pillai RS, 2005).

1.6 Diabetes Mellitus

Diversos achados têm demonstrado que os miRNAs exercem um papel importante na regulação da homeostasia da glicose e apresentam-se alterados no DM (Ozcan, 2014). Um conjunto de miRNAs bem caracterizados são expressos em células beta pancreáticas e nos tecidos alvo de insulina, e muitos estudos tem sido conduzido de forma validar os miRNAs como possíveis biomarcadores no DM (Guay et al., 2012). Um estudo conduzido por Zampetaki (2010) e colaboradores foi um dos primeiros que apresentou um perfil de expressão de miRNA circulante relacionado ao diagnóstico de DM2 (Zampetaki et al., 2010). Nesse estudo prospectivo foi possível identificar cinco miRNAs (miR-15a, miR-28-3p, miR-29b, miR-126 e miR-223) que se apresentaram alterados em pacientes pré-diabéticos ou com DM2. Com esses resultados, foi possível também observar que o perfil desses miRNAs já estava modificado entre 5 a 10 anos antes do início da doença, indicando que os miRNAs circulantes poderiam predizer o desenvolvimento do DM2 (Guay et al., 2013).

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica de etiologia múltipla e das mais prevalentes no mundo. É caracterizado pela hiperglicemia crônica decorrente da deficiência da secreção da insulina, sua ação ou ambos que leva a um distúrbio no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas (ADA, 2021). A hiperglicemia é considerada a principal causa de disfunção ou falência de órgãos em pacientes diabéticos, pois a longo prazo pode causar danos em diversos órgãos e tecidos, resultando em complicações tais como cardiopatia, nefropatia, retinopatia e entre outras (Chen et al., 2018).

Nas últimas décadas, a prevalência do DM tem aumentado cada vez mais no mundo todo. Segundo a Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation - IDF*), existem cerca de 425 milhões de diabéticos no mundo. Estima-se que 629 milhões de pessoas serão acometidas pela doença até 2045. Na América Latina, o DM é apontado como uma das doenças de maior prevalência e, entre esses países, o Brasil lidera com mais de 13 milhões de diabéticos (*International Diabetes Federation, 2019*).

São três tipos principais e mais comuns de DM: Diabetes tipo 1, Diabetes tipo 2 e o Diabetes Gestacional. A noção de que o DM2 apenas acomete adultos e o DM1 ocorre em crianças é equivocada, pois, atualmente, é visto que tais doenças podem ocorrer em ambas as faixas etárias (*ADA, 2021*). O Diabetes Mellitus do tipo 1 (DM1) representa 5-10% das pessoas com diabetes e caracterizado pela deficiência absoluta na produção e secreção de insulina, podendo ser de origem autoimune ou idiopática. Os fatores envolvidos que podem desencadear o DM1 são: uma predisposição genética e/ou fatores ambientais ainda não definidos. A destruição das células beta pancreáticas é bastante variável nessa forma de diabetes, podendo ser rápida em alguns indivíduos (principalmente em crianças) e lenta em outros (principalmente adultos). A obesidade se apresenta rara nesses pacientes, contudo não significa que esse fator seja desconsiderado no diagnóstico de DM1. Há um grande risco de se desenvolver cetoacidose metabólica, entretanto esse processo não parece ser de natureza autoimune. A terapia desses pacientes é realizada com reposição de insulina que tem por objetivo manter os níveis glicêmicos dentro da normalidade. A etiologia de algumas formas de DM1 são desconhecidas e referidas como formas idiopáticas da doença (*SBD, 2020; ADA, 2021*).

Entre os tipos de DM, o tipo 2 (DM2) é o mais frequente, representando cerca de 90-95% das pessoas diagnosticadas com a doença. A principal característica do DM2 é a resistência à ação da insulina, sendo a sua etiologia complexa que envolve vários fatores ambientais e genéticos. Duas deficiências fundamentais são observadas em diabéticos do Tipo 2: (i) redução da sensibilidade à insulina pelos tecidos periféricos e/ou (ii) comprometimento da função das células beta do pâncreas, com redução da secreção de insulina. Logo, o organismo é incapaz de utilizar a insulina efetivamente, resultando em hiperglicemia crônica. É raro a manifestação da

cetoacidose metabólica no DM2, mas pode ocorrer de forma espontânea e está relacionada ao estresse ou infecção (DeFronzo et al., 2015).

O Diabetes pode ocorrer também durante a gestação, sendo classificado como Diabetes Mellitus Gestacional (DMG). É considerado um estado temporário e transitório de intolerância à glicose, o que resulta em hiperglicemia materna de gravidade variável. Seu diagnóstico deve ser feito entre o segundo ou terceiro trimestre da gravidez, período que geralmente o DMG ocorre. Tal condição é capaz de persistir ou não após o parto, sendo um fator de risco para o desenvolvimento do DM2 (SBD, 2020). Durante a gestação, o sistema feto-placentário necessita de uma grande demanda energética para manutenção do desenvolvimento fetal. Em razão disso, o organismo materno promove um aumento na síntese de diversos hormônios como o: estradiol, prolactina, cortisol, progesterona e lactogênio placentário humano (hPL). Tais hormônios levarão a uma resistência à insulina nos tecidos periféricos como o adiposo e o muscular, o que irá garantir a oferta de glicose para o feto (Brolio et al., 2010). Contudo, se esta condição persistir e associada a outros fatores na gestação pode resultar em intolerância à glicose, evoluindo para o DMG. Tal doença representa um risco tanto para saúde da mãe quanto para o feto ou neonato (Mouzon, Lassance, 2015; Barbour et al., 2007). Outras formas de diabetes descritas são as síndromes do diabetes monogênicas, como o diabetes neonatal e o diabetes de início de maturidade dos jovens (MODY). Doenças do pâncreas exócrino, como a fibrose cística e pancreatite, também podem desencadear a doença. Além disso, o diabetes pode ser induzido por uso de certos medicamentos, como os glicocorticoides, no tratamento de HIV/AIDS, ou após transplante de órgãos (SBD, 2020; ADA, 2021).

1.7 Estresse oxidativo e o diabetes

A longa exposição das células a um nível glicêmico elevado pode resultar em uma condição denominada glicotoxicidade e, com isso, prejudicar funções fisiológicas importantes nos tecidos. Estudos demonstraram que o estresse oxidativo é induzido pela hiperglicemia crônica e está envolvido na patogenia do diabetes. Diversas complicações no DM, incluindo danos em diversos tecidos, estão relacionados a essa condição. No DM, a hiperglicemia e a dislipidemia podem levar a formação de AGEs (produtos de glicação avançada), e, nesse processo, há aumento de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo levar ao estresse

oxidativo. Além disso, a alta concentração de glicose pode levar a glicação de proteínas importantes do sistema antioxidante da célula, alterando as suas características estruturais e funcionais. Conseqüentemente, isso resulta na perda da capacidade antioxidante dessas enzimas, refletindo em um aumento da concentração de EROs (Nowotny et al., 2015).

As EROs são espécies químicas que possuem o oxigênio como elemento principal e podem ser classificadas como radicalar, como o $O^{\bullet-2}$ e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) e não radicalar, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Como os elétrons tendem ao pareamento, isso confere maior instabilidade e reatividade química a esses radicais. Em razão disso, as EROs são capazes de reagir com outras biomoléculas, podendo doar elétrons (ação redutora) ou receber elétrons (ação oxidante). (Lee et al., 2019) O $O^{\bullet-2}$ pode ser dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Embora o H_2O_2 não seja um radical livre por não possuir elétrons desemparelhados na última camada, não sendo tão reativo. No entanto, essa espécie reativa pode reagir com o Fe^{2+} , pela reação de Fenton, e ser transformada em OH^{\bullet} , altamente reativo e citotóxico. (Ferreira et al., 1997; HE et al., 2017).

A mitocôndria é considerada a principal fonte geradora de EROs. A respiração celular é um processo pelo qual os organismos aeróbicos obtêm energia, na forma de ATP (adenosina trifosfato), através da oxidação completa de carboidratos, principalmente a glicose. Esse processo pode ser dividido em três etapas básicas: glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. A fosforilação é a última etapa do metabolismo aeróbico da glicose e ocorre na mitocôndria. A membrana dessa organela possui complexos proteicos (I-IV), que formam a cadeia transportadora de elétrons. As moléculas NADH e FADH₂, produzidas pelo metabolismo da glicose, são oxidadas pelos complexos enzimáticos da cadeia. A medida que os elétrons são transportados pela cadeia transportadora, uma grande quantidade de energia é liberada de forma que os prótons (H^+) são bombeados para o espaço intermitocondrial. Assim, é gerado um gradiente de concentração de íons hidrogênio (H^+), a força motriz que impulsiona a ATP-sintase ligar a molécula ADP ao Pi (Fosfato inorgânico) e formar o ATP. A molécula de oxigênio atua comoceptor final de elétrons durante esse processo. Ao receber quatro elétrons, o O_2 se liga a dois íons H^+ , sendo reduzido a água (H_2O). Os complexos da cadeia transportadora de elétrons,

principalmente, o complexo I e o III, podem promover a redução incompleta da molécula de oxigênio, formando o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Hall, Guyton, 2016).

Ademais, outras importantes fontes de geração de EROs são as enzimas da família NADPH-Oxidase (NOX). AS NOXs atuam reduzindo de forma incompleta a molécula de oxigênio, formando $O_2^{\bullet-}$, através da oxidação de NADH. Além das NOX, outras enzimas geradoras de EROs são descritas como a xantina oxidase, monoaminas oxidases, heme oxigenase, lipoxigenases e citocromo p450 redutases (Zhang et al., 2020).

O estado oxido-redução (redox) é determinado pela interação de elementos antioxidantes com a geração de EROs. Dessa forma, a inteiração desses sistemas mantém um estado redox intracelular adequado (Betteridge, 2000; Liguori et al., 2018). As EROs são geradas pelo organismo por processos bioquímicos e essenciais para manutenção do estado redox de modo garantir o desempenho adequado das funções celulares. Além disso, diversos estudos apontam a implicação do estado redox no metabolismo, fluxo de íons, controle transcricional, imunidade e defesa celular, sinalização intercelular e síntese de compostos biológicos (Newsholme et al., 2009).

O sistema antioxidante celular é responsável por regular o estado redox devido a sua capacidade de neutralizar os radicais livres, restringindo ou retardando a oxidação de substratos. Além disso, tal sistema representa a primeira linha de defesa contra a superprodução de EROS, prevenindo possíveis danos à célula. É formado por uma via não enzimática, como a vitamina D (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferol), polifenóis e metais quelantes; e por outra via enzimática, sendo as principais enzimas dessa via: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (Zhang et al., 2020; Ullah et al., 2016). A SOD tem como função catalisar a reação de dismutação de duas moléculas de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 . Diferentes isoformas dessa enzima podem ser encontradas, como no citoplasma na forma de CuZn-SOD (cobre e zinco-superóxido dismutase), na mitocôndria na forma de Mn-SOD (manganês-superóxido dismutase) e no meio extracelular na forma de EC-SOD (extracelular-superóxido) (HE et al., 2017).

As enzimas responsáveis pela remoção do H_2O_2 são a CAT e GPx, as quais impedem o acúmulo do peróxido. A CAT pode ser encontrada nos peroxissomos de diversos tecidos e possui moléculas de NADH ligadas. Assim, essa enzima libera

NAD⁺, o que possibilita maior remoção de peróxido de hidrogênio através do sistema glutathiona peroxidase/redutase, convertendo o peróxido em água e oxigênio (Kirkman, Gaetani, 2007). A GPx é considerada também uma enzima importante na regulação do estado redox na célula, pois, ao converter GSH em GSSG, remove o H₂O₂ e forma a água. Dessa forma, as enzimas antioxidantes CAT e GPx atuam no controle da concentração do O₂^{•-} e de H₂O₂, prevenindo a geração de OH[•], o qual não há sistema enzimático capaz de neutralizá-lo. Outras enzimas também participam da regulação do estado redox como as peroxirredoxinas, as MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógeno) e várias Sirtuínas (Sirts) (Mills, 1959; Babu, Liu, 2008).

O estresse oxidativo é uma condição resultante de um desbalanço entre a produção de EROs e a ação antioxidante endógena. Nesse estado, o sistema antioxidante pode estar saturado e/ou ter a sua capacidade antioxidante reduzida, enquanto ocorre uma produção excessiva dessas espécies reativas. No estresse oxidativo, as EROs, em excesso, são capazes de reagirem com moléculas importantes da célula, como lipídeos, proteínas e DNA; e, desta forma, causar danos estruturais, o que resulta em alterações funcionais importantes (Brownlee, 2001; Luc et al., 2019). Além disso, no estresse oxidativo, as EROs podem interagir com ácidos graxos da membrana e levar a alterações peroxidativas, modificando a sua estrutura lipídica. Nesse processo é gerado diversos produtos tóxicos como o malondialdeído (MDA), um importante biomarcador de estresse oxidativo. Conseqüentemente, isso resultará em modificações biológicas e fisiológicas, como a diminuição da fluidez da membrana e alteração da sua atividade de ligação com enzimas e receptores (Marnett, 1999; Ullah et al., 2016). A hiperglicemia crônica é capaz de aumentar a concentração de EROs e marcadores de estresse oxidativo nas ilhotas pancreáticas. Um estudo feito por Ihara e et al. mostrou, em modelos de animais GK (diabético tipo 2 não obeso), um aumento de marcadores de estresse oxidativo em relação aos animais controle. A inclusão de um hipoglicemiante na dieta desses animais diabéticos reduziu os níveis das EROs. Assim, os autores apontaram que o estado diabético aumenta a geração das espécies reativas *in vivo* e o controle glicêmico pode reduzir esse efeito (Ihara et al., 1999). Em um estudo realizado por Kajimoto (2004), em modelos de ratos diabéticos, observou-se que o tratamento com antioxidantes preservou a massa celular das células beta e a expressão de PDX-1 no núcleo da célula. Com esses resultados, os pesquisadores sugeriram que a redução da ligação

de PDX-1 no DNA, provocada pelo estresse oxidativo, poderia estar envolvida na progressão da disfunção das células beta no diabetes (Kajimoto et al., 2004).

A dislipidemia no DM2 condiciona uma situação denominada lipotoxicidade, que desencadeia também o estresse oxidativo. Briaud et al. (2001) demonstraram que a exposição prolongada das células beta pancreáticas a uma alta concentração de glicose e palmitato reduziram a expressão gênica da insulina (Briaud et al., 2001). Foi observado, em um estudo *in vitro* e *in vivo*, que a alta concentração de ácidos graxos levam à redução da SIEG. Nesses experimentos, verificou-se também a presença de estresse oxidativo nas células beta e nas ilhotas pancreáticas. O tratamento com um agente antioxidante, nesses casos, foi capaz de prevenir tais condições (Oprescu et al., 2007). Desta forma, os estudos apontam que dislipidemia associada a hiperglicemia no DM2 pode afetar negativamente a resposta secretória da célula beta através da geração de espécies reativas (Del Prato, 2009). Além disso, o estresse oxidativo está relacionado à resistência à ação da insulina nos tecidos periféricos e pode prejudicar a síntese e secreção da insulina das células beta (Pickering et al., 2018; Giacco, Brownlee, 2010).

2. Justificativa

As estimativas sobre o Diabetes são preocupantes e alarmantes, pois é previsto que o número de pessoas acometidas pela doença seja ainda maior nos próximos anos. Muitas comorbidades já são bem caracterizadas no DM2 como a obesidade, doenças cardiovasculares, hipertensão, síndrome metabólica, retinopatia, neuropatia, nefropatia, doença renal crônica e entre outras, as quais representam em uma redução da qualidade de vida e aumento de gastos públicos relacionados à saúde. A literatura mostra que a hiperglicemia associada a dislipidemia, uma condição presente nos pacientes com DM2, podem levar ao estresse oxidativo e prejudicar tanto a SIEG nas células beta quanto a sinalização dos hormônios nos tecidos alvo. Considerando que o paciente com DM2 adquire uma deficiência na secreção da insulina, e os miRNAs possuem um papel relevante no desenvolvimento de diferentes tipos de diabetes. Torna-se importante avaliar a associação de padrões de expressão diferencial de miRNAs que regulam genes relacionados à síntese e secreção de insulina no estado de alta glicose e ácido graxo em células secretoras de insulina.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de microRNAs validados em linhagem celular secretora de insulina (INS1-E) como potenciais biomarcadores de disfunção celular. Avaliar a expressão de microRNA que regulem genes relacionados a síntese e secreção da insulina em células beta secretoras de insulina INS1-E.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de miRNAs em linhagem celular secretora de insulina (INS1-E), após 24 horas de incubação com alta concentração de glicose e ácido palmítico.
- Avaliar a geração de EROs (H_2O_2 e O_2^-) em linhagem celular secretora de insulina INS1-E após 24 horas de incubação com alta concentração de glicose e ácido palmítico.

4. Métodos

4.1 Cultura de Células

A linhagem celular utilizada foi a INS1-E beta pancreática, as quais são células de insulinomas de ratos. As células foram incubadas a 37°C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO_2 . O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana e a passagem ocorreu uma vez por semana. As passagens celulares utilizadas foram entre a 70 até 74, sendo cada uma delas um “n” experimental e independente. Alguns estudos mostram que tal linhagem celular pode ser usada e cultivada seguramente entre as passagens 40-100 com a sua função preservada (Merglen et al., 2004). As células INS1-E (1×10^6) foram cultivadas em meio RPMI com 5% de soro fetal bovino. Após as células atingirem 80% de confluência, as células foram plaqueadas e incubadas com diferentes concentrações de glicose e palmitato para análise funcional e análise dos miRNAs. Para realização dos experimentos, as células INS1-E foram mantidas por 48 horas para se aderirem às placas. Em seguida, foram pré-incubadas com 1.1 mM glicose por 40 min e divididas em dois grupos. O grupo controle foi incubado com 5,6 mM de glicose - concentração fisiológica - por

24h; e o grupo tratado com 20 mM de glicose e palmitato 0,1mM durante 24h para mimetizar um estado de glicolipototoxicidade.

4.2 Avaliação de conteúdo de EROs por citometria de fluxo e fluorescência

Para avaliação da produção de EROS, as células foram pré-incubadas com 1.1 mM glicose por 40 min e divididas em dois grupos: o grupo controle foi incubado com 5 mM de glicose (concentração fisiológica) e o grupo tratado com 20 mM de glicose durante 24 horas. Após o estímulo, as amostras foram mantidas por 20 min com dihydroethidium (DHE- Life Technologies, Eugene, Oregon, EUA), na concentração de 5 μ M ou 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA - Eugene, OR, USA), na concentração final de 20 μ M em temperatura ambiente por 20 min e protegidas da luz. A solução de incubação foi removida e as células foram tratadas com 250 μ L de tripsina, durante 3 minutos a 37 °C. Em seguida, 250 μ L de meio de cultura RPMI-1640 foram adicionados aos tubos para a inativação da tripsina. As amostras foram centrifugadas por 5 min/1000 rpm e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 250 μ L de meio de cultura RPMI-1640 sem glicose sobre o pellet e as células foram ressuspensas. Alíquotas das amostras foram colocadas em tubos apropriados para quantificação das EROs por citometria de fluxo (FacsCalibur-BD- (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA). Foram analisados 10.000 eventos por amostra. Os dados relativos ao sinal de fluorescência adquirido no canal FL1 (DCFH) e FL2 (DHE) foram obtidos utilizando software Becton-Dickinson e analisados pelo FlowJo™ v.10.0 (Tree Star, Inc).

4.3 Quantificação da expressão de microRNAs por RT-PCR em tempo real

Foi realizada a extração de RNA total por Trizol®, de acordo com o protocolo do fabricante, para a obtenção de miRNA. A síntese do cDNA foi realizada a partir de 500 ng de RNA total, utilizando-se o kit TaqMan® MicroRNA Assays (Thermofisher) de acordo com as instruções do fabricante. A reação de síntese ocorreu em termociclador convencional de acordo com o seguinte protocolo: 30 min a 16°C, 30 min a 42°C e 5 min a 85°C. O cDNA obtido foi armazenado em freezer – 20°C. Os iniciadores necessários para a amplificação de cada miRNA foram adquiridos no kit *TaqMan® MicroRNA Assays* (Thermofisher). A reação de amplificação do cDNA de cada miRNA foi realizada utilizando o RT-PCR *Array* através

do kit *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Thermofisher) no equipamento 7500 Real-Time PCR System, seguindo o protocolo de amplificação: 1 ciclo por 10 min a 90°C e 40 ciclos por 15s a 95°C e 60s a 60°C. A quantificação relativa dos miRNAs foi realizada por RT-PCR em tempo real utilizando o sistema 7500 Real-Time PCR System (Thermofisher). A quantificação do nível de expressão gênica foi realizada a partir de 46 miRNAs em amostras de células INS1-E do grupo controle e tratado, tendo inicialmente utilizado como genes de referência o snRNA U-87 e o U6 através do método de quantificação relativa por $2^{-\Delta\Delta CT}$. Contudo, esses genes apresentaram variação significativa de expressão entre as amostras do grupo controle e tratado; sendo o miR-7a, eleito como gene controle endógeno por apresentar menor variação de expressão entre os genes avaliados (Suplementar - Tabela S9).

4.4. Eletroforese em gel de RNA

Com o objetivo de avaliar o método de extração e analisar a integridade do RNA total das amostras, foi realizado a técnica de eletroforese em gel. Foi pesado 0,8g de agarose e 68g de água Mili-Q e aquecido em micro-ondas a cada 10 segundos até a sua total dissolução. Foi pipetado 4ml de formaldeído 37% e, em seguida, 3ml de MOP 10x gelado e agitado até sua completa homogeneização. Na solução, foi adicionado 15µL de SYBER Safe gel stain 10000x e colocado na forma. Após isso, foi introduzido o pente e aguardado até esfriar e polimerizar. Na cuba, foi colocado o tampão de corrida MOP1x. Após a polimerização do gel, foi adicionado 1µg de RNA total e ajustado o volume final para 11 µL com água livre de RNase. Em seguida, foi adicionado 5,5 µL de formamida e 1 µL de MOPs 10x, 2 µL de Formaldeído (37%) e 1µL Loading Buffer em cada amostra de RNA, tendo o volume final 20 µl em cada amostra. Foi homogeneizado o tampão da amostra e realizado um spin. As amostras foram aquecidas a 65°C por 5 minutos e depois colocadas no gel por 5 minutos. O gel correu a 70v por aproximadamente a 1h e 20 minutos e protegido da luz para preservar o Syber Safe. Em seguida, o gel foi encaminhado para a revelação.

4.5 Análise estatística

A análise de normalização dos dados foi realizada através do teste de Shapiro-Wilk, sendo $p > 0,05$ para os dados que seguem uma distribuição normal e $p < 0,05$ para os dados que não seguem uma distribuição normal (Suplementar - Tabela

S2-S6). A análise de significância estatística dos dados paramétricos foi realizada através do teste T não pareado e dos dados não paramétricos foi através do teste de Mann-Whitney, sendo $p < 0,05$. Os dados estatísticos e os gráficos foram obtidos pelo programa *GraphPad Prism*® versão 8.0.

5. Resultados

5.1 Avaliação do Conteúdo de EROs.

Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com alta glicose (20mM) e palmitato (0,1mM) nas células beta pancreáticas aumentou significativamente ~170% de conteúdo de EROs em relação ao controle (5,6mM) (Figura 4A e Tabela 1). Quanto ao conteúdo de $O_2^{\bullet-}$, os dados mostraram uma diminuição significativa de ~40% do grupo tratado com alta glicose e palmitato comparado ao controle (Figura 4B e Tabela 1).

Sonda	Grupo	N	Média	EP	Valor de P
DCFH – DA	Controle	3	1	0	0,0015**
	Tratado	3	2,793	0,02331	
DHE	Controle	5	1	0	<0,0001***
	Tratado	5	0,5940	0,1768	

Tabela 1: Tabela da média, mediana, DP (Desvio Padrão) e EP (Erro Padrão) de Valores obtidos de fluorescência de EROs através da sonda DCFH-DA (n=3, ****= $p < 0,01$) e superóxido através da sonda DHE n=5, ***= $p < 0,05$). Os dados seguiram uma distribuição paramétrica (Suplementar - Tabela S2) segundo o teste de normalidade Shapiro-Wilk e, dessa forma, foi realizado o teste T não pareado. Sendo o grupo controle tratado com glicose 5.6mM e do grupo tratado com alta glicose 20mM e palmitato 0,1mM por 24h.

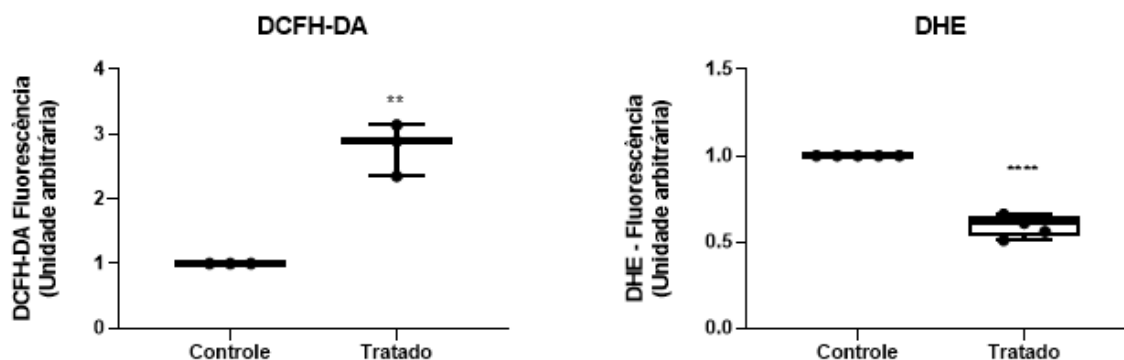


Figura 4: **A)** Detecção de geração de espécies reativas por Citometria de fluxo de peróxido de hidrogênio (DCFH-DA, n=3, ** = $p < 0,005$) e **B)** superóxido (DHE, n=5, **** = $p < 0,0005$) da linhagem secretora de insulina INS-1E do grupo controle com glicose a 5.6 mM e do grupo tratado com alta glicose a 20 mM) e palmitato (0,1 mM).

5.2 Avaliação da expressão dos miRNAs

Para analisar o perfil de expressão dos miRNAs envolvidos na regulação da síntese e secreção da insulina e diferenciação celular de células beta pancreáticas submetidas a alta glicose e ácido graxo, foi realizado um *miRNA array* de amostras de células INS-1E dos grupos tratados com glicose alta (20 mM) e palmitato (0,1 mM). Dos 46 miRNAs avaliados (Figura 5), 26 miRNAs foram detectadas a expressão gênica em todas as amostras (Suplementar - Tabela S4-S8) e 14 miRNAs foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e tratado (Tabela 2).

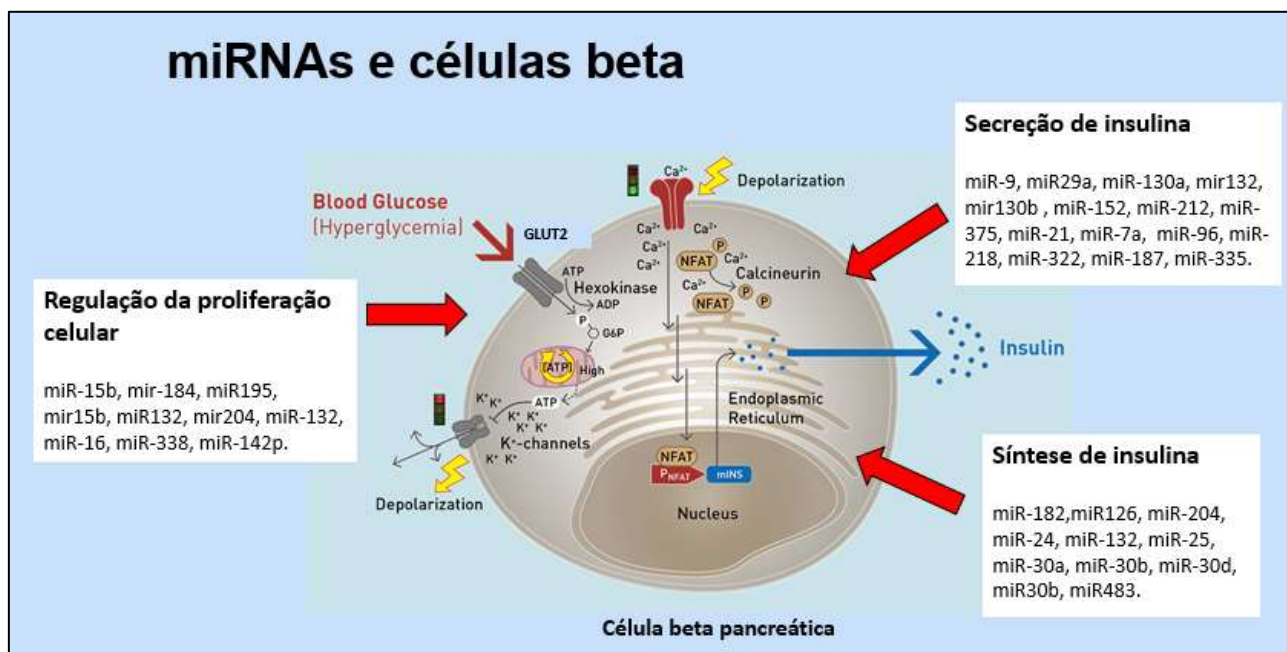


Figura 5: miRNAs envolvidos na Biossíntese da insulina: miR-152, miR-26, miR-182, miR-204, miR-96, miR-335, miR-25, miR-338, miR-142p, miR-124, miR-127, miR-146, miR-148, miR-92a (14miRNAs). **Proliferação e desenvolvimento celular:** miR-17, miR-195, miR-15b, miR-24, miR-30a, miR-30d, miR-30b, miR-483, miR-145, miR-206, miR-101a, miR-199a, miR-29b (13 miRNAs). **Secreção de Insulina:** miR-29a, miR-184, miR-322, miR-9, miR-132, miR-212, miR-130a, miR-130b, miR-375, miR-21, miR-218, miR 7a, miR-187, miR-16, miR-132, miR-19a, miR-185, miR-376a, miR-409 5p (19 miRNAs). Total de 46 miRNAs avaliados. Figura adaptada de: <https://medicalxpress.com/news/2016-12-artificial-beta-cells.html>

miRNA	Grupo	N	Média	Erro Padrão	Análise estatística	Valor de p
miR15b	Controle	5	1	0		
	Tratado	5	0,1236	0,03743	Teste-t não pareado	<0,0001
miR26	Controle	5	1	0		
	Tratado	5	0,6518	0,01759	Teste-t não pareado	<0,0001
miR132	Controle	5	1	0		
	Tratado	5	3,012	0,3045	Teste-t não pareado	0,0002
miR212	Controle	5	1	0		
	Tratado	5	0,428	0,1029	Teste-t não pareado	0,0005
miR29a	Controle	5	1	0		
	Tratado	5	1,386	0,09976	Teste-t não pareado	0,0047
miR182	Controle	5	1	0		
	Tratado	5	0,05728	0,02854	Teste Mann-Whitney	0,0079
miR195	Controle	5	1	0		
	Tratado	5	0,6396	0,04412	Teste Mann-Whitney	0,0079
miR184	Controle	5	1	0		
	Tratado	5	0,7992	0,03496	Teste Mann-Whitney	0,0079
miR9	Controle	5	1	0		
	Tratado	5	0,8072	0,03428	Teste Mann-Whitney	0,0079
miR96	Controle	4	1	0		
	Tratado	5	5,885	3,294	Teste Mann-Whitney	0,0079
miR204	Controle	5	1	0		
	Tratado	5	0,4612	0,1747	Teste-t não pareado	0,015
miR152	Controle	5	1	0		
	Tratado	5	1,775	0,3069	Teste-t não pareado	0,0356
miR130b	Controle	5	1	0		
	Tratado	5	1,332	0,1397	Teste-t não pareado	0,0447
miR130a	Controle	5	1	0		
	Tratado	5	0,9084	0,03889	Teste-t não pareado	0,0463

Tabela 2: Tabela da média, EP (Erro Padrão) e valor de p (*<0,05) da análise de expressão gênica entre o grupo controle tratado com glicose 5.6 mM e do grupo tratado com alta glicose 20 mM e palmitato 0,1 mM por 24h obtidos pelo método 2^{-ddct}, sendo as diferenças estatísticas significativas os dados que tiveram o valor de p<0,05 (Tabela S3).

5.2.1 MiRNAs envolvidos na regulação da proliferação celular.

Os miRNAs avaliados e envolvidos na regulação da proliferação e desenvolvimento celular das células beta pancreáticas foram os miR-17, miR-195, miR-15b, miR-24, miR-30a, miR-30d, miR-30b, miR-483, miR-145, miR-206, miR-101a, miR-199a, miR-29b (13 miRNAs). Desses miRNAs, cinco apresentaram diferença estatística entre o grupo controle e tratado, sendo o miR15-b, miR-132, miR-184, miR 195 e o miR-204. O mir-132 apresentou um aumento significativo de 201% do grupo tratado em relação ao controle. Os miR-184 (-20%), miR-195 (-36%), miR-15b (-88%) e o miR-204 (-54%) mostrou uma redução significativa do grupo tratado em relação o controle (Figura 6 e Tabela 2 e 3).

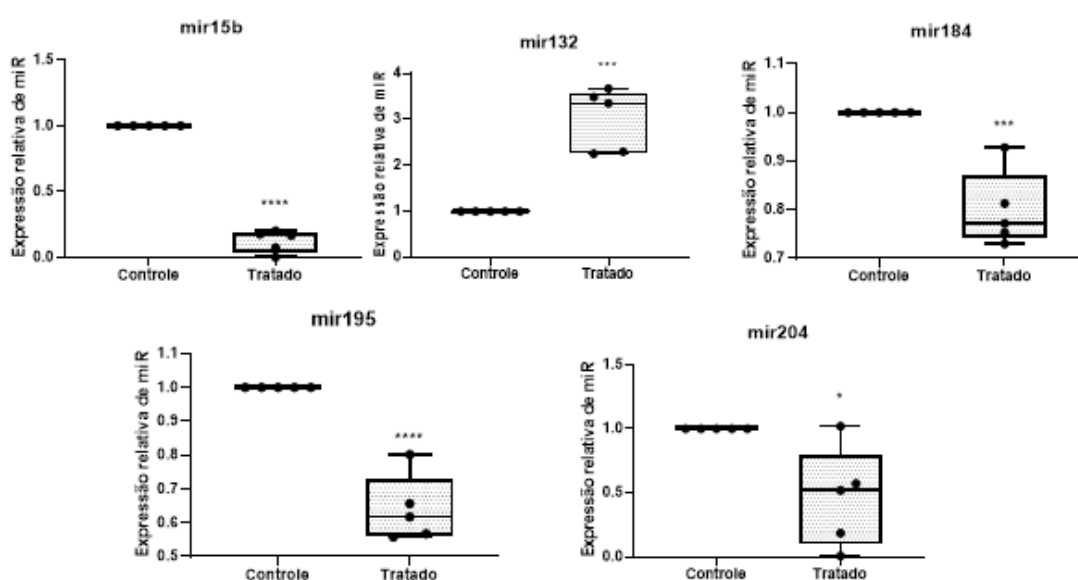


Figura 6: Expressão de miRNAs envolvidos na regulação da proliferação e desenvolvimento da linhagem secretora de insulina INS-1E do grupo controle submetido a glicose 5.6mM e do grupo tratado com alta glicose a 20mM e palmitato 0,1mM por 24h (n=5; * p <0,05, ** p<0,005 e *** p<0,0005).

Expressão	Gene	Desenvolvimento / proliferação celular	Autor
mir-132	201%	regulação positiva	Nesca et al., 2013
mir-184	-20%	regulação negativa	Bolmeson et al., 2011
miR-195	-36%	regulação negativa	Joglekar et al., 2007

miR-15b	-88%	regulação negativa	Joglekar et al., 2007
*miR- 204	-54%	regulação negativa	Gaddam et al., 2020

Tabela 3: Tabela dos miRNAs relacionados com a função de desenvolvimento e proliferação celular das células beta pancreáticas. Os miRNAs marcados com asterisco (*) estão associados a outra função celular como o miR-204 envolvido na regulação da biossíntese de insulina (Tabela 4).

5.2.2 MiRNAs envolvidos na regulação da biossíntese de insulina.

Os miRNAs avaliados e envolvidos na regulação da proliferação e desenvolvimento celular das células beta pancreáticas foram 14 miRNAs: miR-152, miR-26, miR-182, miR-204, miR-96, miR-335, miR-25, miR-338, miR-142p, miR-124, miR-127, miR-146, miR-148, miR-92a. Desse miRNAs, quatro miRNAs apresentaram diferença estatística entre o grupo controle e tratado, incluindo o miR-204 (-54%), miR-26 (-35%) e o miR-182 (-95%), que tiveram uma redução significativa de expressão gênica entre o grupo tratado e controle (Figura 7 e Tabela 2 e 4).

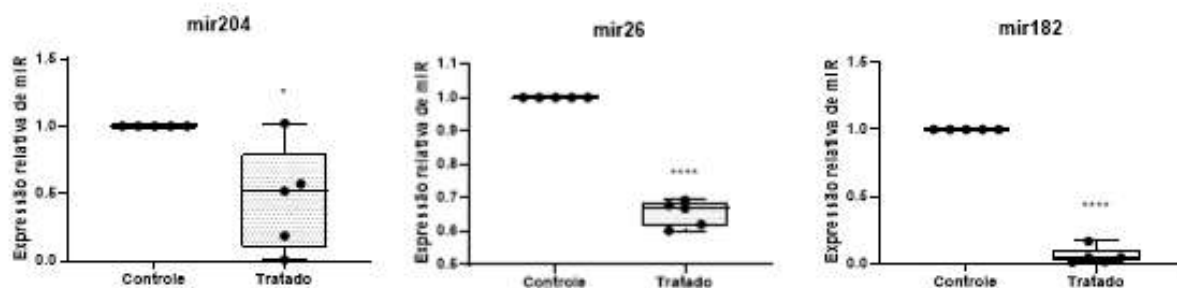


Figura 7: Expressão de miRNAs envolvidos na regulação da biossíntese de insulina da linhagem secretora de insulina INS-1E do grupo controle submetido a glicose 5.6 mM e do grupo tratado com alta glicose a 20 mM e palmitato 0,1 mM por 24h (n=5; * p <0,05, ** p<0,005 e *** p<0,0005).

Gene	Expressão	Biossíntese da insulina	Autor
*miR-204	-54%	regulação negativa	Xu et al., 2013
miR-26	-35%	regulação positiva	Melkman-Zehavi et al., 2011
miR-182	-95%	regulação positiva	Melkman-Zehavi et al., 2011

Tabela 4: Tabela dos miRNAs relacionados com a função de biossíntese de insulina das células beta pancreáticas e suas respectivas funções. Os miRNAs marcados com asterisco (*) estão associados a outra função celular como o miR-204 na regulação do desenvolvimento e proliferação (Tabela 3).

5.2.3 MiRNAs envolvidos na regulação da secreção de insulina.

Para a avaliação da expressão de miRNAs envolvidos na regulação da secreção da insulina, os genes avaliados foram: miR-29a, miR-184, miR-322, miR-9, miR-132, miR-212, miR-130a, miR-130b, miR-375, miR-21, miR-218, miR-7a, miR-187, miR-16, miR-132, miR-19a, miR-185, miR-376a, miR-409 5p. Dos 19 miRNAs, 9 apresentaram diferença de expressão significativa estatisticamente entre o grupo tratado e controle. O miR-9 (-20%), miR-184 (-20%), miR130a (-10%) e o miR-212(-58%) tiveram sua expressão reduzida após o tratamento com alta glicose (20mM) e palmitato, após 24 horas em relação ao controle (Figura 8 A-B, Tabela 2 e 5). O miR-132 (201%), o miR-29a(38%), o miR-152(78%), miR-130b(30%) e o miR-96 (408%) tiveram sua expressão aumentada no grupo tratado em relação ao controle (Figura 8 A-B, Tabela 2 e 5).

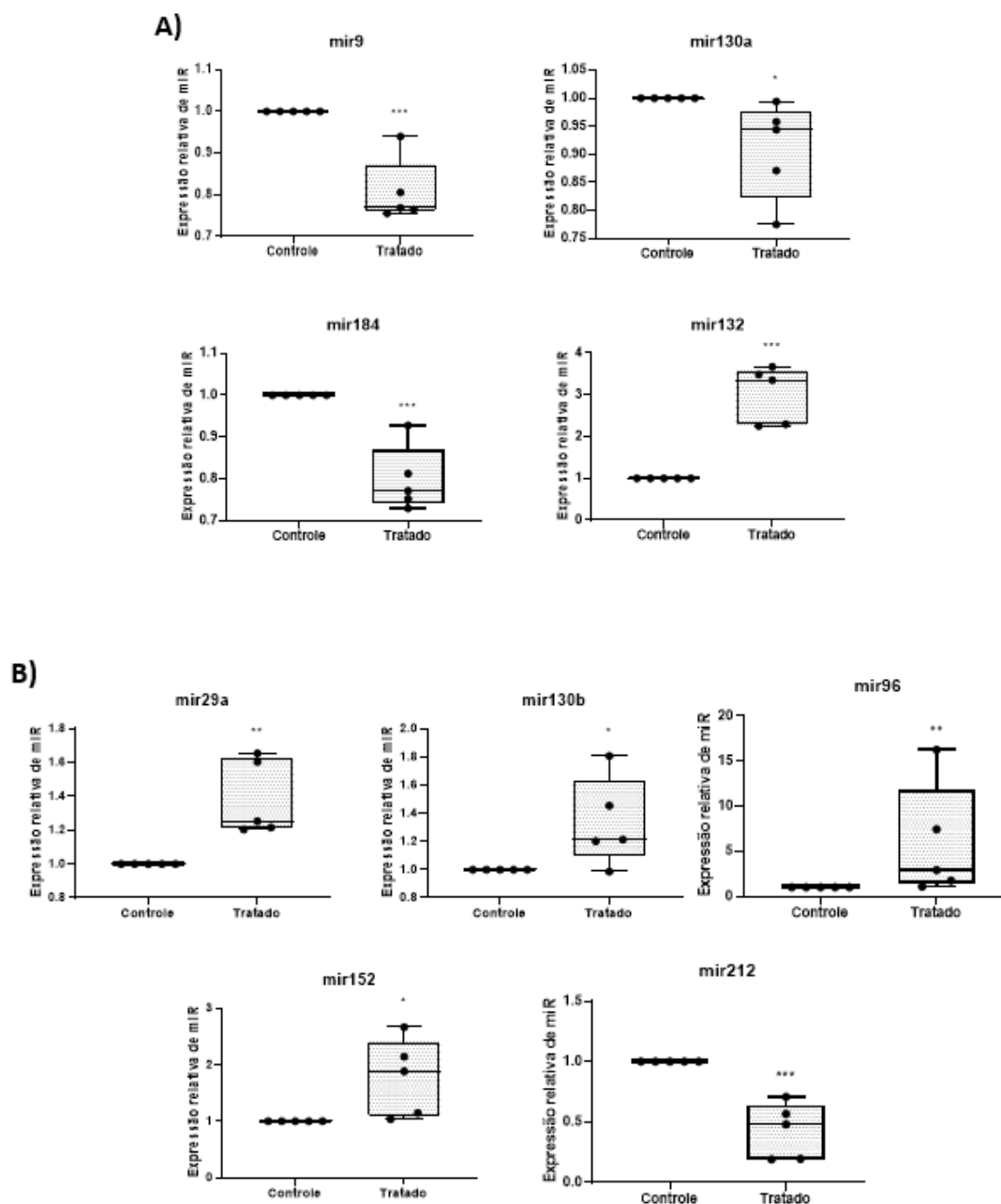


Figura 8: Expressão de miRNAs envolvidos na regulação da secreção de de insulina da linhagem secretora de insulina INS-1E do grupo controle submetido a glicose 5.6mM e do grupo tratado com alta glicose a 20mM e palmitato 0,1mM por 24h (n=5; * p <0,05, ** p<0,005 e *** p<0,0005) (Tabela 5 e. Figura A): são os miRNAs alterados, os quais se esperariam obter um possível aumento da secreção de insulina. (Tabela 5 e Figura B): são os miRNAs alterados os quais se esperariam obter uma redução da secreção de insulina.

Gene	Expressão	Secreção da insulina	Autor
mir-9	-20%	regulação negativa	Plaisance et al., 2006
*mir-184	-20%	regulação negativa	Bolmeson et al., 2011

mir-130a	-10%	regulação negativa	Esguerra et al. 2011
mir-29a	39%	regulação negativa	Roggli et al., 2010
mir-152	78%	regulação negativa	Alejandro et al., 2014
mir-130b	33%	regulação negativa	Esguerra et al. 2011
miR-96	488,50%	regulação negativa	Lovis et al., 2008
mir-132	201%	regulação positiva	Soni et al., 2014
mir-212	-58%	regulação positiva	Soni et al., 2014

Tabela 5: Tabela dos miRNAs relacionados com a secreção de insulina das células beta pancreáticas e suas respectivas funções. Os miRNAs marcados com asterisco (*) são aqueles envolvidos em outra função celular como o miR-184 envolvido também na regulação do desenvolvimento e proliferação (Tabela 3).

6. Discussão

6. 1 Avaliação do conteúdo de EROs nas células beta submetidas a alta glicose e palmitato

Muitos estudos apresentam que a condição de hiperglicemia crônica pode levar ao estresse oxidativo e prejudicar funções importantes nas células beta pancreáticas (BINDOKAS et al., 2003; KRAUSS et al., 2003; MORGAN et al., 2009). Estudos anteriores observaram um aumento da concentração de superóxido em células INS1-E e ilhotas pancreáticas isoladas após incubação aguda (1h) com palmitato (Graciano et al., 2013; Morgan et al., 2007). Em nosso protocolo experimental, as células INS1-E foram incubadas com alta glicose e palmitato por 24h, o que levou a diminuição do conteúdo de superóxido. O mecanismo pelo qual os ácidos graxos livres promovem a geração de EROs poderia ser explicada pela ativação de NADPH oxidase, como demonstrado por Morgan et al., 2007. Embora as células beta pancreáticas possuam baixa expressão de enzimas antioxidantes, estudos mostram que a célula, quando exposta a altas concentrações de glicose, é capaz de suprimir a formação de EROs e superóxido via ativação do ciclo pentose fosfato (Rebelato et al., 2011) e aumento da razão de NAPH/NADH⁺ (Munhoz et al., 2016; Martens et al., 2005). Apesar de estudos apontarem que as células beta apresentem baixos níveis de enzimas antioxidantes tais como a GPx, CAT e tireoredoxina comparado a outros tecidos (Newsholme et al., 2007, Evans et al., 2003), é possível que a alta atividade da SOD seja responsável pela redução dos níveis do O^{•2}. Além

disso, a glicolipototoxicidade também está associada com a disfunção mitocondrial, o que poderia explicar a redução da formação do radical anion superóxido pela organela (Somesh et al., 2013; Barlow et al., 2013).

Os nossos resultados mostraram que a alta glicose e ácido graxo podem levar ao acúmulo de EROs na célula beta pancreática. Como o H_2O_2 pode ser formado a partir da dismutação do ânion superóxido catalisada pela enzima SOD. Possivelmente, o aumento do conteúdo de EROs poderia ser explicada pela alta atividade antioxidante da SOD e, subsequente, aumento de peróxido de hidrogênio. Em um estudo realizado por Schultheis et al (2019), no qual as células beta foram submetidas a alta concentração de glicose, foi observado uma redução progressiva da concentração de $O_2^{\cdot-}$, enquanto a concentração de EROs aumentou concomitantemente (0-48h) comparado ao grupo controle. Foi proposto que isso poderia indicar a formação elevada de H_2O_2 por dismutação de ânion radicais superóxido (Schultheis et al., 2019). Foi demonstrado que a exposição crônica (48h) a alta glicose (30mM) não era capaz de alterar a expressão da Cu/Zn e Mn Sod ou da Catalase (Tiedge et al., 1997). No entanto, em outro estudo observou-se que a longa exposição (72h) a alta glicose (33 mM) resultou em um aumento da transcrição e tradução do MnSOD e Cu/ZnSod e da Catalase em células beta pancreáticas (Kim et al., 2017). Oliveira e colaboradores (1999) demonstraram que a exposição aguda (1h) a alta glicose (16,7mM) não alterou a atividade da CAT ou GPX, mas foi capaz de aumentar a atividade de Cu/Zn SOD. Além disso, esse efeito teve uma relação com um aumento da taxa de secreção de insulina (Oliveira et al., 1999).

A presença de baixas concentrações de peróxido de hidrogênio em ilhotas mostrou prejudicar a secreção de insulina, quando submetidas tanto a baixa ou alta glicose, através da inibição do metabolismo de glicose e conseqüente prejuízo no manejo de cálcio intracelular (Rebelato et al., 2010). Em modelos de glicotoxicidade, Tanaka (2002) e colaboradores demonstraram que a baixa pré-disposição da GPx em ilhotas pode levar ao acúmulo de EROs, e, conseqüentemente, reduzir a expressão de RNAm da insulina (Tanaka et al., 2002). Além disso, o H_2O_2 pode ser neutralizado pela ação da CAT. Contudo, estas enzimas possuem também uma menor expressão em relação a outros tipos celulares (Lenzen et al., 1996). Desta forma, a baixa atividade da GPx e da CAT, provavelmente, poderia explicar o aumento do conteúdo de EROs. Além disso, estudos relataram que a deficiência de CAT aumenta o risco de desenvolver DM2 (Goth et al., 2008). Nosso protocolo experimental visa mimetizar

condições presentes no DM2 tais como alta concentração de glicose e ácidos graxos. Esses resultados mostram que a exposição prolongada a hiperglicemia e dislipidemia pode levar o acúmulo de EROs e, essa condição, a longa prazo, pode prejudicar a SIEG na célula.

6.2 Expressão dos miRNAs nas células beta submetidas a alta glicose e palmitato.

Vários achados mostram que miRNAs são reguladores fundamentais de diferentes aspectos da homeostase da glicose, como sinalização periférica de insulina (Nigi et al., 2018) e no processo secretório do hormônio pelas células beta pancreáticas (Sebastiani et al., 2015).

6.2.1 Expressão dos miRNAs relacionados a desenvolvimento e proliferação das células beta pancreáticas

Tem sido evidenciado que a redução da massa das células beta pancreáticas está envolvida na patogênese do DM1 e DM2. A hiperglicemia crônica no DM foi apontada ser a causa dessa perda de massa celular, seja através da apoptose e/ ou da proliferação celular prejudicada (Donath et al., 2004). Diversos estudos demonstraram que diversos miRNAs estão envolvidos no controle da proliferação e desenvolvimento das células beta pancreáticas como o miR-132 (Nesca et al., 2013), miR-184 (Bolmeson et al., 2011), miR-195, miR-15b (Joglekar et al., 2007) e o miR204 (Gaddam et al., 2020). O miR-132 regula positivamente a proliferação celular e o tratamento com alta glicose aumentou a sua expressão na célula. O aumento da expressão do miR-132 poderia levar ao aumento do processo proliferativo. Além disso, o miR-132 está envolvido na regulação positiva da secreção de insulina. Os miR-184, miR-195, o miR-15b e o miR-204, as quais regulam negativamente a proliferação celular se mostraram reduzidos, após a exposição com alta glicose e ácido graxo. Nessa condição, a alteração da expressão desse miRNAs poderia levar ao aumento da proliferação celular.

A proliferação das células beta pode ser modulada positivamente pela glicose e ácido graxo sinergicamente e reversivelmente (Prentki et al., 2006; Moullé et al., 2009). Alguns estudos apontam que nos processos de dessensibilização à insulina nos tecidos insulino-dependentes, como na gravidez, obesidade e no DM2, é

observado uma expansão da massa das células beta pancreáticas e tal efeito é descrito como uma forma de compensar a resistência à insulina (Sachdeva, Stoffers, 2009; Hanley et al., 2010).

Outros achados mostram que durante a progressão do DM2, a apoptose e a expansão das células beta pancreáticas ocorrem simultaneamente no qual o aumento da massa celular poderia ser explicado pela resposta compensatória contínua da célula (Meier et al., 2005; Keenan et al., 2010). Levit e colaboradores (2011) demonstraram que a hiperglicemia leva ao aumento da massa celular em ilhotas de pacientes não-diabéticos transplantadas em modelos de animais NOD (Levit et al., 2011). Tal efeito poderia ser uma resposta compensatória da célula devido à alta demanda de glicose gerada pela resistência à insulina (Roggli et al., 2012). O aumento da expressão do mir-132 em nossos resultados também é observado em animais DM2 e essa condição mostrou estar associada ao aumento da proliferação das células beta (Nesca et al., 2013). Em modelos de animais DM2, o mir-184 também tem sua expressão reduzida e demonstrado que essa condição está relacionada a expansão da massa celular das células beta pancreáticas como resposta compensatória a resistência insulínica. Diferente dos nossos resultados, o mir-15b e o miR-195 foram encontrados aumentados em ilhotas durante o estágio de desenvolvimento e essa condição mostrou estar relacionado com mecanismos regulatórios da neogênese neo-natal (Joglekar et al., 2007). Dessa forma, a alteração de tais miRNAs, dos quais podem ser modulados pela alta glicose e ácido graxo poderia estar envolvida no aumento da massa celular das ilhotas observado no DM2.

6.2.2 Expressão dos miRNAs relacionados a biossíntese de insulina.

A glicotoxicidade pode provocar uma alteração na expressão do gene da insulina acompanhada por reduções no conteúdo de insulina e uma disfunção na secreção do hormônio. Em modelos de animais diabéticos DM2 foi observado diversos miRNAs alterados em ilhotas relacionados com a disfunção das células beta pancreáticas (Guay et al., 2011; Ozcan et al., 2014; Filios, Shalev, 2015). Conforme os nossos resultados, a alteração da expressão dos miRNAs-26, miR-182 poderia indicar uma redução na síntese da insulina. Como o miR-26, e o miR-182, por regularem positivamente, estão com a sua expressão reduzida no grupo tratado, isso poderia favorecer a redução da síntese de insulina. Melkman-Zehavi e colaboradores

(2011) identificaram diversos miRNAs, dentre eles o miR-26 e o miR-182 relacionados a regulação da biossíntese de insulina. Foi demonstrado, em células beta pancreáticas, que a inibição desses miRNAs resultaram em um decréscimo da expressão de insulina, conseqüentemente, no conteúdo do hormônio via regulação de fatores repressores de transcrição (Melkman-Zehavi et al., 2011).

Um estudo realizado por Xu e colaboradores demonstrou que o miR-204 se encontra aumentado em ilhotas de animais DM2 e é responsável por regular negativamente a biossíntese e conteúdo de insulina via regulação do fator de transcrição de insulina MafA. Vale ressaltar que no estudo realizado por Xu et al, o aumento da expressão do miR-204 na célula beta INS-1 foi induzido pela superexpressão da proteína de interação com a tiorredoxina (TXNIP), um regulador do estado redox celular, que se encontra aumentado em animais DM2 (Xu et al., 2013). Gaddam e colaboradores demonstram que a deleção do miR-204 em ilhotas, melhorou a homeostasia da glicose prejudicada em camundongos diabéticos geneticamente modificados. Além disso, nesse estudo foi verificado que a inibição do miR-204 resultou em um aumento da proliferação das células beta pancreáticas e uma diminuição da CHOP expressão, um marcador de estresse do retículo endoplasmático (Gaddam et al., 2020). Em nossos resultados, a alta glicose e ácido graxo por 24h reduziu a expressão do miR-204. Assim, poder-se-ia esperar que a diminuição da expressão do miR-204 levasse a um aumento da biossíntese de insulina. Contudo, considerando que os miRNAs podem regular mais que um alvo (Moreno-Moya et al., 2014), sugere-se que essa diminuição do miR-204 pela alta glicose e ácido graxo pode estar relacionada a regulação positiva da proliferação celular. A diferença de expressão do miR-204 em animais e nossos resultados pode ser devido a dinâmica de expressão *in vivo* poder ser diferente da cultura celular; considerando que o aumento da expressão do miR-204 encontrado em animais DM2 pode ser causado pelo aumento da TXNIP (Xu et al.), ou seja, por outros fatores além da exposição aguda a alta glicose e ácido graxo. A exposição crônica à alta glicose associado ao palmitato pode prejudicar a SIEG e a transcrição de insulina (Schultheis et al., 2019; Somesh et al., 2013; Briuad et al., 2001). Desse modo, sugere-se que a alta glicose associada ao ácido graxo poderia modular miRNAs capazes de alterar a biossíntese de insulina e, possivelmente, envolvidos na redução da transcrição de insulina, como observado no DM2.

6.2.3 Expressão dos miRNAs relacionados a regulação da secreção da insulina.

A redução da expressão dos miRNAs: miR-9, miR-184, miR-130a, que regulam negativamente o processo secretório de insulina e a expressão aumentada do miR132, que regula positivamente a função, poderia indicar um aumento no processo secretório de insulina. Contudo, o aumento da expressão dos miRNAs 29a, miR-152, miR-130b e o miR96 que regulam negativamente a secreção da insulina, com a expressão diminuída do miR-212, que regula positivamente, poderia sugerir uma diminuição da função secretória do hormônio pelas células beta pancreáticas. Segundo o nosso protocolo experimental, as células beta pancreáticas ficaram submetidas a alta glicose e ácido graxo por 24h. Rebelato e colaboradores (2018), demonstraram que a exposição alta glicose por 24h poderia potencializar o processo secretório da insulina na célula (Rebelato et al.,2018). É possível observar que esse efeito permanece mesmo sendo associado o ácido graxo ao tratamento se comparar ao grupo controle (Kim et al., 2015). Assim, sugere-se que os miRNAs miR-9, miR-184, miR-130a poderiam estar envolvidos no aumento do processo secretório de insulina nas células beta pancreáticas quando expostas à alta glicose e ácido graxo por 24h.

No entanto, a longa exposição (48h-72h) a alta glicose associada ao palmitato pode prejudicar a SIEG e a transcrição de insulina (Schultheis et al., 2019; Somesh et al., 2013; Briaud et al., 2001). Em ilhotas de modelos de animais diabéticos, o miR-29a (aumentado), miR-130b (aumentado) e o miR-152 (aumentado) estão com a sua expressão alterada e a essa condição mostrou estar envolvida com a redução do processo secretório de insulina (Roggli et al., 2012; Esguerra et al., 2011; Ofori et al., 2014). Essa alteração no perfil de expressão desse miRNAs em modelos de animais diabéticos seguem a mesma direção de modulação dos nossos resultados. Assim, a alteração desses miRNAs induzidas pela alta glicose e ácido graxo, possivelmente, apontaria para uma futura mudança de alteração na função celular das células beta pancreáticas, como a redução na secreção do hormônio, sendo potenciais biomarcadores de disfunção celular.

A superexpressão do miR-132 e do miR-212 mostrou elevar a SIEG pelas células beta via regulação negativa da carnitina-acilcarnitina translocase (CACT), a

qual modula negativamente a secreção de insulina (Soni et al., 2014). A expressão do miR-132 em modelos animais se encontra aumentada e o tratamento agudo com alta glicose nas células beta manteve o resultado. O miR-212 também está aumentado nesses animais, diferente dos nossos resultados. Um estudo conduzido por Shang e colaboradores (2014) mostrou que a expressão do miR-132 e do miR-212 pode ser modulada positivamente por incretinas (GLP1) em células beta pancreáticas (Shang et al., 2014). Assim, como as condições *in vivo* diferem da *in vitro*, outros fatores, além da alta glicose e ácido graxo poderiam modular a expressão do miR-212 em modelos de animais diabéticos.

miRNA	INS1-E: G20mM+P0,1mM		Autor
	/G 5.6mM (24h)	Expressão em outros modelos	
mir132	↑ (201%)	↑ Ilhotas de modelos animais diabéticos	Nesca et al., 2013, Soni et al., 2014
miR-29a	↑ (39%)	↑ Ilhotas de modelos animais diabéticos	Roggli et al., 2012
mir-212	↓ (-58%)	↑ Ilhotas de modelos animais diabéticos	Soni et al., 2014
mir-184	↓ (-20%)	↓ Ilhotas de modelos animais diabéticos	Bolmeson et al., 2011
miR-204	↓ (-54%)	↑ Ilhotas de modelos animais diabéticos	Xu et al., 2013
mir-130a	↓ (-10%)	↑ Ilhotas de modelos animais diabéticos	Esguerra et al. 2011
mir-130b	↑ (33%)	↑ Ilhotas de modelos animais diabéticos	Esguerra et al. 2011
mir-195	↓ (-36%)	↑ pancreas em desenvolvimento de camundongos	Joglekar et al., 2007
mir-15b	↓ (-88%)	↑ pancreas em desenvolvimento de camundongos	Joglekar et al., 2007
mir-152	↑ (78%)	↑ Ilhotas de modelos animais diabéticos e humanos	Alejandro et al., 2014; Ofori et al., 2014

Tabela 6: Comparativo de expressão de miRNAs do grupo tratado (Glicose 20Mm + P0,1mM) / controle (Glicose 5.6Mm) e em modelos de animais diabéticos.

O miR-375, apesar de ser bem expresso nas células beta pancreáticas, no entanto, em nossos resultados, a exposição a alta glicose e ácido graxo (24h) não alterou significamente a sua expressão em relação ao grupo controle. Estudos realizados para validar miRNAs como bio marcadores do DM2 identificaram a alteração da expressão do miR-375 no sangue de pacientes diabéticos em relação aos diagnosticados com pré-diabetes ou suscetíveis à doença (Karolina et al., 2012; Kong et al, 2011).

Uma análise de array de miRNAs nas células beta mostrou que não houve mudanças no nível de expressão do miR-375 em diferentes concentrações de glicose (Tang et al., 2009). Alguns estudos trazem que a expressão do miR-375 não está alterada em ilhotas de doadores DM2 comparado a de indivíduos não diabéticos (Ofori et al., 2017; Esguerra et al., 2011). Foi demonstrado que danos em ilhotas poderiam elevar proporcionalmente a expressão do miR-375 (Kanak et al., 2015). A expressão do miR-7a foi encontrada reduzida em modelos animais diabéticos (Latreille et al., 2014), mas a exposição aguda a hiperglicemia e dislipidemia não alterou a sua expressão em nossos resultados. Assim, provavelmente, outros fatores *in vivo* além da hiperglicemia e ácido graxo poderiam modular a expressão de tais miRNAs.

6.2.4 Expressão de miRNAs relacionados ao estado de óxido-redução das células.

Foi possível identificar os miRNAs que tiveram alterações em nosso protocolo experimental como o miR-15b, miR-182, miR-195 e o miR-130a, envolvidos na modulação do conteúdo de EROs em outros tipos celulares. O envolvimento do miR-15b no estado redox foi demonstrado em podócitos no qual o aumento do conteúdo de EROs e MDA, um marcador de estresse oxidativo, induzido por alta glicose foi suprimido pela superexpressão do miRNA. Neste estudo, a alta glicose levou também a redução da expressão do miR-15b e concomitantemente uma redução na atividade total da SOD e CAT, e um aumento da expressão da NOX-4, enquanto a superexpressão do miRNA reverteu esses efeitos (Fu et al., 2019). Da mesma forma, em nossos resultados foi possível observar que a alta glicose associada ao ácido graxo levou também a redução da expressão e ao aumento do conteúdo de EROS. Por outro lado, em macrófagos, a superexpressão do miR-15b modulou positivamente o conteúdo de EROs (Qianru et al., 2021).

Estudos demonstraram que o aumento da expressão do miR-182 levou a redução do conteúdo de EROs e MDA, e aumentou a atividade total da SOD em células de lentes de ratos com cataratas (Yao et al., 2020) e em modelo de aterosclerose (Qin et al., 2018) comparado ao grupo controle. De outra forma, segundo os nossos resultados, o tratamento com alta glicose e ácido graxo reduziu a expressão do miR-182 e aumentou o conteúdo de EROs em células beta. Em podócitos foi possível observar também que a superexpressão do miR-130a diminui

os níveis de EROs e MDA induzidos pela alta glicose e aumentou a concentração de SOD (Jiang et al., 2017). A expressão do miR-130a foi reduzida e conteúdo de EROs aumentado com o tratamento com alta glicose e ácido graxo de acordo com os nossos resultados.

Em um estudo realizado em células epiteliais de retina foi possível detectar que a alta glicose aumentou a expressão do miR-195. A superexpressão do miR-195 reverteu os efeitos antioxidantes do Astragalus, aumentando o conteúdo de MDA e diminuindo a atividade total da SOD em células expostas a alta glicose (Liu et al., 2019). Diferente dos nossos resultados, o tratamento com alta glicose levou a diminuição da expressão do miR-195 e ao aumento do conteúdo de EROs.

Li e colaboradores apresentaram em seus resultados que a superexpressão do miR-29a contribuiu para a supressão da formação EROs induzida por alta glicose e aumento da atividade da enzima SOD em células epiteliais humanas de lente ocular (Li et al., 2021). Por outro lado, para analisar o papel dos miRNAs em células-tronco mensequimais, observou-se que a superexpressão do miR-29a levou a redução do conteúdo de EROs. Além disso, também aumentou a expressão da Mg-SOD através regulação negativa de DNMT3 (DNA metiltransferase 3-alfa), um regulador epigenético (Jung et al., 2020). Em cardiomiócitos, foi possível observar um efeito oposto em que a superexpressão do miR29-a, levou ao aumento do conteúdo de MDA e a uma diminuição da atividade total da SOD (Ding et al., 2020). Em nossos resultados, a expressão do miR-29a e o conteúdo de EROs estão aumentados.

Assim, o miR-15b, miR-182 e o miR-130a desses estudos (Fu et al., 2019; Yao et al., 2020; Qin et al., 2018; Jiang et al., 2017) tiveram uma relação similar de expressão e o conteúdo de EROs com os nossos resultados. Contudo, os miR-29a e o miR-195 tiveram uma relação diferente da sua expressão e do conteúdo de EROs com os nossos experimentos (Li et al., 2021; Liu et al., 2019). A dinâmica de expressão dos miRNAs pode ocorrer de forma diferente em cada tipo de celular ou entre espécies (Kriegel et al., 2013, Kim et al., 2014). Além disso, um único miRNA é capaz de regular diferentes alvos, ou um único alvo pode ser regulador por diversos miRNAs (Moreno-Moya et al., 2014; Ha, Kim, 2014). Assim, conforme esses achados, é possível que tais miRNAs tenham a mesma função, como a regulação do estado redox, em diversos tipos celulares.

Além disso, um estudo também mostrou que o aumento de conteúdo de EROs induzido por frutose foi capaz de modular negativamente a expressão do miR-15b via fator de transcrição 2 de homeodomínio pareado (Pitx2) em cardiomiócitos (Kang et al., 2019). Assim, o aumento da concentração de EROs também poderia regular a expressão desses miRNAs. É descrito que diversos miRNAs são expressos em resposta a EROs para mediar o estresse oxidativo. Por outro lado, o estresse oxidativo pode levar à regulação positiva de miRNAs que controlam mecanismos para reduzir o dano induzido por EROs (Climent et al., 2020). Assim, os miRNAs não necessariamente poderiam modular o conteúdo de EROs, mas tais espécies reativas também poderiam alterar a expressão dos miRNAs (direta ou indiretamente) nas células beta pancreáticas. Assim, tais miRNAs, provavelmente, estejam envolvidos na regulação do estado redox nas células beta pancreáticas.

7. Conclusão

Além da resistência à insulina nos tecidos periféricos, a disfunção das células beta pancreáticas, incluindo a redução progressiva da secreção de insulina, que está envolvida no desenvolvimento e patogênica do DM2. O estresse oxidativo gerado pela hiperglicemia e dislipidemia, uma condição persistente no DM2, tem sido associado aos danos na célula e, conseqüentemente, prejuízos no processo secretório. Embora tenham estudos que apresentem que a glicolipotoxicidade aumenta a formação de ânion superóxido nas ilhotas, segundo os nossos resultados, a exposição aguda (24h) a alta glicose e ácido graxo diminuiu o conteúdo de superóxido nas células beta pancreáticas. Por outro lado, é possível observar que a redução do radical anion superóxido e aumento da concentração de EROs poderia indicar uma elevação do peróxido de hidrogênio através da dismutação do superóxido pela enzima SOD. Contudo, a redução do radical anion superóxido na célula também poderia ser ocasionada por outros fatores.

Foi observado também que a exposição aguda a alta glicose e ácido graxo foi capaz de modular o conteúdo de miRNAs, que regulam funções importantes na célula, como a proliferação e diferenciação das células beta e no processo de síntese e secreção da insulina. Tais pequenos RNAs não-codificantes podem estar envolvidos na regulação de várias vias de sinalização celulares, participando de maneira importante no desenvolvimento e manutenção do pâncreas endócrino e na regulação

da síntese e secreção de insulina. Em relação aos miRNAs associados a regulação da proliferação celular (miR15b miR-132, miR-184, miR-195 e o miR204), as alterações desses poderiam se esperar um aumento da proliferação celular. Tal efeito, então, poderia ser uma resposta compensatória a alta demanda de glicose de forma produzir mais insulina.

Na regulação da secreção de insulina, os miRNAs: miR-9, o miR130a, miR132 e o miR-184 apontam para um possível aumento da secreção de insulina. É reportado que a exposição das células beta pancreáticas a alta glicose com ou sem adição do ácido graxo por 24h, aumenta a secreção de insulina na célula. Dessa forma, sugere-se que tais miRNAs poderiam estar envolvidos nesse processo. Por outro lado, o miR-29a, miR96, miR-130b, miR152 e o miR212 estão envolvidos também na regulação do processo secretório do hormônio e a modulação pela alta glicose e ácido graxos (24h) poderia se esperar uma redução na secreção de insulina. Em modelos de animais diabéticos, todos esses miRNAs se encontram alterados e foi demonstrado que essa alteração estava envolvida na redução da SIEG nesses animais. Além disso, a longa exposição a alta glicose e ácido por 48h leva a glicolipototoxicidade, reduzindo o processo de síntese e secreção de insulina nas células beta. Dessa forma, a alteração desses miRNAs poderiam indicar uma futura disfunção nas células beta pancreáticas, sendo potenciais biomarcadores de disfunção celular.

Recentemente, várias evidências apontam uma forte associação entre o estresse oxidativo e os miRNAs. Através dos nossos resultados, foi possível identificar miRNAs modulados pela alta glicose e ácido graxo estão envolvidos no estado redox e também no estresse oxidativo em outros tipos celulares. Isso pode sugerir que tais miRNAs estejam envolvidos no estado redox das células beta pancreáticas ou no estresse oxidativo no DM2.

8. Referências

1. Roder PV, WU B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*. 2016; 48(219):1-19.
2. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1999;341(4):248-57.

3. Robertson RP, Harmon JS. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radic Biol Med*. 2006;41(2):177-84.
4. Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(10):572-587.
5. Boron WF, Boulpaep EL. *Fisiologia Médica*. 2 ed. Elsevier, 2015. p.1075.
6. Hall EJ, Guyton AC. *Guyton & Hall: Tratado de Fisiologia Médica*. 13 ed. Elsevier, 2016.
7. Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*. 2012;55(10):2565-2582.
8. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev*. 1995;16(2):117-42.
9. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev*. 2018;98(4):2133-2223.
10. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion. *Curr Diabetes Rev*. 2013;9(1): 25–53.
11. Liu M, Weiss AM, Arunagiri A, et al. Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20 Suppl 2: 28–50.
12. Tokar VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J. Cell Biol*. 2018. 217(7):2273-2289.
13. Poirout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmonz JS. Regulation of the Insulin Gene by Glucose and Fatty Acids. *J. Nutr*. 2006;136(4): 873–876.
14. Kim MK, Kim HS, Lee IK, Park KG. Endoplasmic Reticulum Stress and Insulin Biosynthesis: A Review. *Experimental. Diabetes Research*. 2012;1: 1-7.
15. Haber EP, Curi R, Carvalho CRO, Carpinelli AR. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. *Arq Bras End Metab*. 2001;45(3): 219-227.
16. Zawulich WS, Zawulich KC. Regulation of insulin secretion by phospholipase C. *Am J Physiol*. 1996;271(34): E409-E416.

17. Yamazaki H, Zawulich KC, Zawulich WS. Physiologic Implications of Phosphoinositides and Phospholipase C in the Regulation of Insulin Secretion. *J Nutr Sci Vit.* 2010;56(1):1-8.
18. Dumortier O, Van Obberghen E. MicroRNAs in pancreas development. *Diabetes Obes Metab.* 2012;14 Suppl 3:22-8.
19. Guay C, Jacovetti C, Nesca V, Motterle A, Tugay K, Regazzi R. Emerging roles of non-coding RNAs in pancreatic β -cell function and dysfunction. *Diabetes Obes Metab.* 2012;14 Suppl 3:12-21.
20. Li X. MiR-375, a microRNA related to diabetes. *Gene.* 2014;533(1):1-4.
21. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature.* 2004;432(7014):226-30.
22. Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, Braun M, Collins S, Rorsman P, et al. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(14):5813-8.
23. Roggli E, Britan A, Gattesco S, Lin-Marq N, Abderrahmani A, Meda P, et al. Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 2010;59(4):978-86.
24. Roggli E, Gattesco S, Caille D, Briet C, Boitard C, Meda P, et al. Changes in microRNA expression contribute to pancreatic β -cell dysfunction in prediabetic NOD mice. *Diabetes.* 2012;61(7):1742-51.
25. Plaisance V, Abderrahmani A, Perret-Menoud V, Jacquemin P, Lemaigre F, Regazzi R. MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *J Biol Chem.* 2006;281(37):26932-26942.
26. Lovis P, Gattesco S, Regazzi R. Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs. *Biological chemistry.* 2008 Mar;389(3):305-12.
27. Lang H, Ai Z, You Z, et al. Characterization of miR-218/322-Stxbp1 pathway in the process of insulin secretion. *J Mol Endocrinol.* 2015;54(1):65-73.

28. Bravo-Egana, V., et al. 2008. Quantitative differential expression analysis reveals miR-7 as major islet microRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 366:922–926.
29. Latreille M, Hausser J, Stützer I, et al. MicroRNA-7a regulates pancreatic β cell function. *J Clin Invest.* 2014;124(6):2722-2735.
30. Alejandro EU, Gregg B, Wallen T, et al. Maternal diet-induced microRNAs and mTOR underlie β cell dysfunction in offspring. *J Clin Invest.* 2014;124(10):4395-4410.
31. Locke JM, da Silva Xavier G, Dawe HR, Rutter GA, Harries LW. Increased expression of miR-187 in human islets from individuals with type 2 diabetes is associated with reduced glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetologia.* 2014;57(1):122-128.
32. Melkman-Zehavi T, Oren R, Kredon-Russo S, et al. MiRNAs control insulin content in pancreatic b-cells via downregulation of transcriptional repressors. *EMBO J* 2011;30:835–845.
33. Bolmeson C, Esguerra JL, Salehi A, Speidel D, Eliasson L, Cilio CM. Differences in islet-enriched miRNAs in healthy and glucose intolerant human subjects. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;404(1):16-22. doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.024.
34. Nesca V, Guay C, Jacovetti C, et al. Identification of particular groups of microRNAs that positively or negatively impact on beta cell function in obese models of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2013;56(10):2203-2212.
35. Soni MS, Rabaglia ME, Bhatnagar S, Shang J, Ilkayeva O, Mynatt R, et al. Downregulation of carnitine acyl-carnitine translocase by miRNAs 132 and 212 amplifies glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes.* 2014;63(11):3805–14.
36. Joglekar MV, Parekh VS, Mehta S, Bhonde RR, Hardikar AA. MicroRNA profiling of developing and regenerating pancreas reveal post-transcriptional regulation of neurogenin3. *Dev Biol.* 2007;311:603–612.
37. Xu G, Chen J, Jing G, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein regulates insulin transcription through microRNA-204. *Nat Med* 2013;19:1141–1146.

38. Salunkhe VA, Ofori JK, Gandasi NR, et al. MiR-335 overexpression impairs insulin secretion through defective priming of insulin vesicles. *Physiol Rep.* 2017;5(21):e13493.
39. Ofori JK, Salunkhe VA, Bagge A, et al. Elevated miR-130a/miR130b/miR-152 expression reduces intracellular ATP levels in the pancreatic beta cell. *Sci Rep.* 2017;7:44986.
40. Shen Z, Yu Y, Yang Y, et al. miR-25 and miR-92b regulate insulin biosynthesis and pancreatic β -cell apoptosis. *Endocrine.* 2022;76(3):526-535.
41. Jacovetti C, Abderrahmani A, Parnaud G, et al. MicroRNAs contribute to compensatory β cell expansion during pregnancy and obesity. *J Clin Invest* 2012; 122:3541–3551.
42. Kim JW, You YH, Jung S, et al. miRNA-30a-5p-mediated silencing of Beta2/NeuroD expression is an important initial event of glucotoxicity-induced beta cell dysfunction in rodent models. *Diabetologia.* 2013;56(4):847-855.
43. Zheng Y, Wang Z, Tu Y, et al. miR-101a and miR-30b contribute to inflammatory cytokine-mediated β -cell dysfunction. *Lab Invest.* 2015;95(12):1387-1397.
44. Tang X, Muniappan L, Tang G, Ozcan S. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic beta cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription. *RNA* 2009;15:287–293.
45. Zhao X, Mohan R, Özcan S, Tang X. MicroRNA-30d induces insulin transcription factor MafA and insulin production by targeting mitogen-activated protein 4 kinase 4 (MAP4K4) in pancreatic β -cells. *J Biol Chem* 2012;287: 31155–31164.
46. Mohan R, Mao Y, Zhang S, et al. Differentially Expressed MicroRNA-483 Confers Distinct Functions in Pancreatic β - and α -Cells. *J Biol Chem.* 2015;290(32):19955-19966.
47. Guay C, Kruit JK, Rome S, et al. Lymphocyte-Derived Exosomal MicroRNAs Promote Pancreatic β Cell Death and May Contribute to Type 1 Diabetes Development. *Cell Metab.* 2019;29(2):348-361.e6.

48. Sharp PA. The Centrality of RNA. *Cell*. 2009;136(4):578-580.
49. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854.
50. Moreno-Moya JM, Sci M, Vilella F, Simon C. MicroRNA: key gene expression regulators. *Fertil Steril*. 2014;101(6):1516-23.
51. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Molecular Cell Biology*. 2014;15(8): 509-524.
52. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Review Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004;116(2): 281–297.
53. Lee Y, Han J, Yeom KH, Jin H, Kim VN. Drosha in Primary MicroRNA Processing. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 2006;71:51-59.
54. Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinol*. 2013;9(9):513-21.
55. Boon RA, Vickers KC. Intercellular Transport of MicroRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33(2):186–192.
56. Bartel DP. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009;136(2): 215–233.
57. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4): 642–655.
58. Berg A, Mols J, Han J. RISC-target interaction: Cleavage and translational suppression. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1779(11):668–677.
59. Jackson RJ, Standart N. How Do MicroRNAs Regulate Gene Expression? *Science Stke*. 2007;2007(36):1-7.
60. Pillai RS. MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA?. *RNA*. 2005;11(12):1753–1761.

61. Ozcan S. Minireview: microRNA function in pancreatic β cells. *Mol Endocrinol*. 2014;28(12):1922-33.
62. Guay C, Jacovetti C, Nesca V, Motterle A, Tugay K, Regazzi R. Emerging roles of non-coding RNAs in pancreatic β -cell function and dysfunction. *Diabetes Obes Metab*. 2012;14 Suppl 3:12-21.
63. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res*. 2010;107(6):810-7.
64. Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinol*. 2013;9(9):513-21.
65. American Diabetes Association (ADA). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes - 2021. *Diabetes Care* 2021;44(Suppl. 1):S15–S33.
66. Chen W, Sun Q, Ju J, Chen W, Zhao X, et al. Effect of Astragalus Polysaccharides on Cardiac Dysfunction in db/db Mice with Respect to Oxidant Stress. *Biomed Res Int*. 2018;(15):1-10.
67. International Diabetes Federation (IDF). Across the globe. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org/across-the-globe.html>>. Acesso em: 14 fev. 2019.
68. Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019, 2020. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/DIRETRIZES-COMPLETA-2019-2020.pdf>> Acesso em: 15 mar. 2020.
69. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15019.
70. Brolio, M. Ambrosio CE, Franciulli AR, Morini AC, et al. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. *Rev Bras Reprod Anim*. 2010;34(4): 222-232.
71. Mouzon SH, Lassance L. Endocrine and metabolic adaptations to pregnancy; impact of obesity. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2015;24(1):65-72.

72. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30(Suppl 2):S112-9.
73. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*. 2015;5(1):194-222.
74. Lee BWL, Ghode P, Ong DST. Redox regulation of cell state and fate. *Redox Biol*. 2019;25:101056.
75. Ferreira, A. L.; Matsubara, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
76. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(2):532-553.
77. Zhang P, Li T, Wu X, Nice EC, Huang C, Zhang Y. Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies. *Front Med*. 2020;14(5):583-600. doi:10.1007/s11684-019-0729-1.
78. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000;49 2 Suppl 1:3-8.
79. Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:757-772.
80. Newsholme P, Morgan D, Rebelato E, Oliveira-Emilio HC, Procopio J, Curi R, Carpinelli A. Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. *Diabetologia*. 2009;52(12):2489-98.
81. Ullah A, Khan A, Khan I. Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2016;24(5):547-553.
82. Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(1):44-50.
83. Mills GC. The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *J Biol Chem*. 1959;234(3):502-6.

84. Babu PV, Liu D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem*. 2008;15(18):1840-50.
85. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
86. Luc K, Schramm-Luc A, Guzik TJ, Mikolajczyk TP. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *J Physiol Pharmacol*. 2019;70(6):10.26402.
87. Marnett LJ. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC Sci Publ*. 1999(150):17-27.
88. Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, et al. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999;48(4):927–932.
89. Kajimoto Y, Kaneto H. Role of Oxidative Stress in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction. *Ann NY Acad Sci*. 2004;1011:168–176.
90. Briaud I, Harmon JS, Kelpel CL, Segu VBG, Poitout V. Lipotoxicity of the Pancreatic B-Cell is Associated with Glucose-Dependent Esterification of Fatty Acids into Neutral Lipids. *Diabetes*. 2001;50(2):315-321.
91. Oprescu AI, Bikopoulos G, et al. Free Fatty Acid–Induced Reduction in Glucose-Stimulated Insulin Secretion: Evidence for a Role of Oxidative Stress In Vitro and In Vivo. *Diabetes*. 2007;56(12):2927–2937.
92. Del Prato S. Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabet Med*. 2009;26(12):1185–1192.
93. Pickering RJ, Rosado CJ, Sharma A, et al. Recent novel approaches to limit oxidative stress and inflammation in diabetic complications. *Clinical & Translational Immunology*. 2018;1016(7):1-20.
94. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107(9):1058–1070.

95. Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology*. 2004;145(2):667-678.
96. Bindokas VP, Kuznetsov A, Sreenan S, Polonsky KS, Roe MW, Philipson LH. Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9796-9801.
97. Krauss S, Zhang CY, Scorrano L, et al. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1831-1842.
98. Graciano MF, Valle MM, Curi R, Carpinelli AR. Evidence for the involvement of GPR40 and NADPH oxidase in palmitic acid-induced superoxide production and insulin secretion. *Islets*. 2013;5(4):139-148.
99. Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D, Hirata AE, Santos da Rocha M, Bordin S, Curi R, Newsholme P, Carpinelli AR. Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia*. 2007;50(2):359-369.
100. Rebelato E, Abdulkader F, Curi R, Carpinelli AR. Control of the intracellular redox state by glucose participates in the insulin secretion mechanism. *PLoS One*. 2011; 6(8):e24507.
101. Munhoz AC, Riva P, Simões D, Curi R, Carpinelli AR. Control of Insulin Secretion by Production of Reactive Oxygen Species: Study Performed in Pancreatic Islets from Fed and 48-Hour Fasted Wistar Rats. *PLoS One*. 2016;11(6):e0158166. Published 2016 Jun 30. doi:10.1371/journal.pone.0158166
102. Martens GA, Cai Y, Hinke S, Stangé G, Van de Casteele M, Pipeleers D. Glucose suppresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic beta cells. *J Biol Chem*. 2005;280(21):20389-20396. doi:10.1074/jbc.M411869200

103. Newsholme, P.; Haber, E.P.; Hirabara, S.M.; Rebelato, E.L.O.; Procopio, J.; Morgan, D.; Oliveira-Emilio, H.C.; Carpinelli, A.R.; Curi, R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: Role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol.* 2007, 583, 9–24.
104. Evans, J.L.; Goldfine, I.D.; Maddux, B.A.; Grodsky, G.M. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003, 52, 1–8.
104. Somesh BP, Verma MK, Sadasivuni MK, et al. Chronic glucolipotoxic conditions in pancreatic islets impair insulin secretion due to dysregulated calcium dynamics, glucose responsiveness and mitochondrial activity. *BMC Cell Biol.* 2013;14:31.
105. Barlow J, Affourtit C. Novel insights into pancreatic β -cell glucolipotoxicity from real-time functional analysis of mitochondrial energy metabolism in INS-1E insulinoma cells. *Biochem J.* 2013;456(3):417-426.
106. Schultheis J, Beckmann D, Mulac D, Müller L, Esselen M, Düfer M. Nrf2 Activation Protects Mouse Beta Cells from Glucolipotoxicity by Restoring Mitochondrial Function and Physiological Redox Balance. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Nov 11;2019:7518510.
107. Tiedge, M., S. Lortz, J. Drinkgern, and S. Lenzen. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidant defense status of insulin-producing cells. *Diabetes.* 1997. 46: 1733–1742.
108. Kim MK, Shin HM, Jung H, et al. Comparison of pancreatic beta cells and alpha cells under hyperglycemia: Inverse coupling in pAkt-FoxO1. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;131:1-11.
109. Oliveira HR, Curi R, Carpinelli AR. Glucose induces an acute increase of superoxide dismutase activity in incubated rat pancreatic islets. *Am J Physiol.* 1999;276(2):C507-C510. doi:10.1152/ajpcell.1999.276.2.C507.

110. Rebelato E, Abdulkader F, Curi R, Carpinelli AR. Low doses of hydrogen peroxide impair glucose-stimulated insulin secretion via inhibition of glucose metabolism and intracellular calcium oscillations. *Metabolism*. 2010;59(3):409-413.
111. Tanaka Y, Tran PO, Harmon J, Robertson RP. A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(19):12363-12368.
112. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20(3):463–6.
112. Góth L. Catalase deficiency and type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2008;31(12):e93.
114. Nigi, L.; Grieco, G.E.; Ventriglia, G.; Brusco, N.; Mancarella, F.; Formichi, C.; Dotta, F.; Sebastiani, G. Micrnas as regulators of insulin signaling: Research updates and potential therapeutic perspectives in type 2 diabetes. *Int J Mol Sci*. 2018, 19, 3705.
115. Sebastiani, G.; Po, A.; Miele, E.; Ventriglia, G.; Ceccarelli, E.; Bugliani, M.; Marselli, L.; Marchetti, P.; Gulino, A.; Ferretti, E.; et al. MicroRNA-124a is hyperexpressed in type 2 diabetic human pancreatic islets and negatively regulates insulin secretion. *Acta Diabetol*. 2015, 52, 523–530.
116. Donath MY, Halban PA. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia*. 2004;47(3):581-589
117. Gaddam RR, Kim YR, Li Q, et al. Genetic deletion of miR-204 improves glycemic control despite obesity in db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;532(2):167-172.
118. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1802-12.
119. Moullé VS, Ghislain J, Poitout V. Nutrient regulation of pancreatic β -cell proliferation. *Biochimie*. 2017 Dec;143:10-17.

120. Sachdeva MM, Stoffers DA. Minireview: Meeting the demand for insulin: molecular mechanisms of adaptive postnatal beta-cell mass expansion. *Mol Endocrinol*. 2009;23(6):747–758.
121. Hanley SC, et al. Beta-cell mass dynamics and islet cell plasticity in human type 2 diabetes. *Endocrinology*. 2010;151(4):1462–1472.
122. Meier JJ, Bhushan A, Butler AE, Rizza RA, Butler PC. Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration?. *Diabetologia*. 2005;48(11):2221-2228.
123. Keenan HA, Sun JK, Levine J, et al. Residual insulin production and pancreatic β -cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin Medalist Study. *Diabetes*. 2010;59(11):2846-2853.
124. Levitt HE, Cyphert TJ, Pascoe JL, et al. Glucose stimulates human beta cell replication in vivo in islets transplanted into NOD-severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Diabetologia*. 2011;54(3):572-582.
125. Roggli E, Gattesco S, Caille D, et al. Changes in microRNA expression contribute to pancreatic β -cell dysfunction in prediabetic NOD mice. *Diabetes*. 2012;61(7):1742-1751. doi:10.2337/db11-1086.
126. Guay C, Roggli E, Nesca V, Jacovetti C, Regazzi R. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Transl Res*. 2011;157(4):253-64.
127. Filios SR, Shalev A. β -Cell MicroRNAs: Small but Powerful. *Diabetes*. 2015;64(11):3631-3644.
128. Rebelato, E., Santos, L.R., Carpinelli, A.R. et al. Short-term high glucose culture potentiates pancreatic beta cell function. *Sci Rep*. 2018; (8), 13061.
129. Kim M, Lee JS, Oh JE, Nan J, Lee H, Jung HS, Chung SS, Park KS. SIRT3 Overexpression Attenuates Palmitate-Induced Pancreatic β -Cell Dysfunction. *PLoS One*. 2015 Apr 27;10(4):e0124744.

130. Esguerra JL, Bolmeson C, Cilio CM, Eliasson L. Differential glucose-regulation of microRNAs in pancreatic islets of non-obese type 2 diabetes model Goto-Kakizaki rat. *PLoS One*. 2011;6(4):e18613.
131. Shang J, Li J, Keller MP, Hohmeier HE, Wang Y, Feng Y, Zhou HH, Shen X, Rabaglia M, Soni M, Attie AD, Newgard CB, Thornberry NA, Howard AD, Zhou YP. Induction of miR-132 and miR-212 Expression by Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) in Rodent and Human Pancreatic β -Cells. *Mol Endocrinol*. 2015 Sep;29(9):1243-53.
132. Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SL, Wong MT, et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(12):E2271-6.
133. Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetol*. 2011;48(1):61-9.
134. Tang X, Muniappan L, Tang G, Ozcan S. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic beta cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription. *RNA* 2009;15:287–293.
135. Kanak MA, Takita M, Shahbazov R, et al. Evaluation of MicroRNA375 as a Novel Biomarker for Graft Damage in Clinical Islet Transplantation. *Transplantation*. 2015;99(8):1568-1573.
136. Fu Y, Wang C, Zhang D, Chu X, Zhang Y, Li J. miR-15b-5p ameliorated high glucose-induced podocyte injury through repressing apoptosis, oxidative stress, and inflammatory responses by targeting Sema3A. *J Cell Physiol*. 2019;234(11):20869-20878.
137. Qianru C, Xueyuan H, Bing Z, Qing Z, Kaixin Z, Shu L. Regulation of H₂S-induced necroptosis and inflammation in broiler bursa of Fabricius by the miR-15b-5p/TGFBR3 axis and the involvement of oxidative stress in this process. *J Hazard Mater*. 2021;406:124682.

138. Yao L, Yan H. MiR-182 inhibits oxidative stress and epithelial cell apoptosis in lens of cataract rats through PI3K/Akt signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(23):12001-12008. doi:10.26355/eurrev_202012_23988.
139. Qin SB, Peng DY, Lu JM, Ke ZP. MiR-182-5p inhibited oxidative stress and apoptosis triggered by oxidized low-density lipoprotein via targeting toll-like receptor 4. *J Cell Physiol*. 2018;233(10):6630-6637. doi:10.1002/jcp.26389.
140. Jiang Y, Wang W, Liu ZY, Xie Y, Qian Y, Cai XN. Overexpression of miR-130a-3p/301a-3p attenuates high glucose-induced MPC5 podocyte dysfunction through suppression of TNF- α signaling. *Exp Ther Med*. 2018 Jan;15(1):1021-1028.
141. Liu P, Peng QH, Tong P, Li WJ. Astragalus polysaccharides suppresses high glucose-induced metabolic memory in retinal pigment epithelial cells through inhibiting mitochondrial dysfunction-induced apoptosis by regulating miR-195. *Mol Med*. 2019 May 22;25(1):21.
142. Li H, Xu L, Song H. MiR-29a Alleviates High Glucose-induced Inflammation and Mitochondrial Dysfunction via Modulation of IL-6/STAT3 in Diabetic Cataracts. *Curr Eye Res*. 2021;46(9):1325-1332.
143. Jung YD, Park SK, Kang D, et al. Epigenetic regulation of miR-29a/miR-30c/DNMT3A axis controls SOD2 and mitochondrial oxidative stress in human mesenchymal stem cells. *Redox Biol*. 2020;37:101716.
144. Ding S, Liu D, Wang L, Wang G, Zhu Y. Inhibiting MicroRNA-29a Protects Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Targeting SIRT1 and Suppressing Oxidative Stress and **NLRP3**-Mediated Pyroptosis Pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 2020;372(1):128-135.
145. Kriegel AJ, Liu Y, Liu P, Baker MA, Hodges MR, Hua X, Liang M. Characteristics of microRNAs enriched in specific cell types and primary tissue types in solid organs. *Physiol Genomics*. 2013 Dec 1;45(23):1144-56.
146. Kim YW, Kim EY, Jeon D, Liu JL, Kim HS, Choi JW, Ahn WS. Differential microRNA expression signatures and cell type-specific association with Taxol resistance in ovarian cancer cells. *Drug Des Devel Ther*. 2014 Feb 24;8:293-314.

147. Kang LL, Zhang DM, Jiao RQ, Pan SM, Zhao XJ, Zheng YJ, Chen TY, Kong LD. Pterostilbene Attenuates Fructose-Induced Myocardial Fibrosis by Inhibiting ROS-Driven Pitx2c/miR-15b Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Dec 4;2019:1243215.
148. Climent M, Viggiani G, Chen YW, Coulis G, Castaldi A. MicroRNA and ROS Crosstalk in Cardiac and Pulmonary Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4370.
149. Ramachandran KM, Tsokos CP. Categorical data analysis and goodness-of-fit tests and applications, *Mathematical Statistics with Applications in R (Terceira edição)*, Academic Press. 2021;(11),p461-490.
150. King AP, Eckersley RJ. - Inferential Statistics IV: Choosing a Hypothesis Test, *Statistics for Biomedical Engineers and Scientists*. Academic Press, 2019;(7)p147-171.
151. Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ, Kerin MJ, Miller N. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Mol Biol*. 2008;9:76.
152. Thermo Fisher®. Using TaqMan® Endogenous Control Assays to select an endogenous control for experimental studies. Disponível em: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_042279.pdf> Acesso em 22.06.2022

9. SUPLEMENTAR

9.1 Teste de Normalidade – Shapiro Wilk.

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados devido ao seu alto poder estatístico e ser recomendado em amostragem pequenas cujo tamanho de “n” fosse entre 3 a 50 (n=5). Foi verificado se os dados seguiram uma distribuição normal (Gaussiana) aqueles que tiveram o valor de $p > 0,05$, os dados que não tiveram uma distribuição não paramétrica, foram os que obtiveram o valor de $p < 0,05$. Além disso, se o valor de W é menor que os valores críticos para o teste de Shapiro-wilk (n=5, valor de 99% de confiança > 0,806), isso significa que os dados não seguem uma distribuição normal (Ramachandran et al., 2021; King et al., 2019).

MiRNA	Grupo	N	Média	Valor de W	Valor de p	Distribuição Gaussiana? (alpha=0,05)
miR15b	Controle	5	1			
	Tratado	5	0,1236	0,8839	0,1445	Sim
miR26	Controle	5	1			
	Tratado	5	0,6518	0,9093	0,2764	Sim
U6	Controle	4	1			
	Tratado	4	0,02925	0,9099	0,3534	Sim
miR132	Controle	5	1			
	Tratado	5	3,012	0,8766	0,1191	Sim
miR212	Controle	5	1			
	Tratado	5	0,428	0,8775	0,1223	Sim
miR29a	Controle	5	1			
	Tratado	5	1,386	0,8625	0,0817	Sim
miR182	Controle	5	1			
	Tratado	5	0,05728	0,7071	0,0011	Não
miR195	Controle	5	1			
	Tratado	5	0,6396	0,7788	0,008	Não
miR184	Controle	5	1			
	Tratado	5	0,7992	0,7923	0,0117	Não
miR9	Controle	5	1			
	Tratado	5	0,8072	0,6948	0,0008	Não
miR96	Controle	4	1			
	Tratado	5	5,885	0,7912	0,0113	Não
miR204	Controle	5	1			
	Tratado	5	0,4612	0,8510	0,0596	Sim
miR152	Controle	5	1			
	Tratado	5	1,775	0,8789	0,1266	Sim
miR130b	Controle	5	1			
	Tratado	5	1,332	0,8583	0,0728	Sim
miR130a	Controle	5	1			
	Tratado	5	0,9084	0,8665	0,0909	Sim
U87	Controle	5	1			
	Tratado	5	2,12	0,8606	0,0777	Sim
miR30d	Controle	4	1			
	Tratado	4	0,8533	0,9011	0,2957	Sim
miR335	Controle	5	1			
	Tratado	5	6,852	0,8617	0,0800	Sim
miR21	Controle	5	1			
	Tratado	5	476,1	0,8552	0,0670	Sim
miR30a	Controle	5	1			
	Tratado	5	0,8476	0,7195	0,0015	Não
miR30b	Controle	5	1			
	Tratado	5	2,813	0,6382	0,0002	Não
miR375	Controle	5	1			
	Tratado	5	2,178	0,6427	0,0002	Não

miR322	Controle	5	1	0,8641	0,0853	Não
	Tratado	5	2,138			
miR218	Controle	5	1	0,8661	0,0899	Não
	Tratado	5	0,9454			

Tabela S1: Teste de normalidade através do teste de Shapiro-wilk pelo programa Graphpad Prism versão 8.0 dos valores obtidos de expressão do miRNA array entre as amostras do grupo tratado e controle.

Sonda	Grupo	N	Média	Erro Padrão	Valor de W	Valor de P	Distribuição Gaussiana? (alpha=0,05)
DHE	Controle	5	1	0	0,8966	0,2008	Sim
	Tratado	5	0,594	0,02657			
DCFH-DA	Controle	3	1	0	0,8781	0,2604	Sim
	Tratado	3	0,6518	0,1768			

Tabela S2: Teste de normalidade através do teste de Shapiro-wilk pelo programa Graphpad Prism versão 8.0 dos valores obtidos do conteúdo de EROS entre as amostras do grupo tratado e controle.

9.2 Valores do Teste de Shapiro Wilk, Teste T não pareado e Teste de Mann Whitney.

Se os dados seguissem uma distribuição gaussiana pelo teste de normalidade (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$), foi utilizado o teste T não pareado e os dados que não passaram pelo teste, ou seja, tiverem o valor de $p < 0,05$ foi utilizado o teste de Mann-Whitney. As diferenças entre o grupo tratado e controle foram consideradas significativas estatisticamente cujo valores do Teste T não pareado e Mann-Whitney fossem $p < 0,05$ (Ramachandran et al., 2021; King et al., 2019).

miRNA	Grupo	N	Média	Erro Padrão	Valor de p (Shapiro Wilk)	Análise estatística	Valor de p
miR-15b	Controle	5	1	0	0,1445	Teste-t não pareado	0,0001
	Tratado	5	0,1236	0,03743			
miR-26	Controle	5	1	0	0,2764	Teste-t não pareado	0,0001
	Tratado	5	0,6518	0,01759			
U6	Controle	4	1	0	0,3534	Teste-t não pareado	0,0001
	Tratado	4	0,02925	0,009543			
miR-132	Controle	5	1	0	0,1191	Teste-t não pareado	0,0002
	Tratado	5	3,012	0,3045			
miR-212	Controle	5	1	0	0,1223	Teste-t não pareado	0,0005
	Tratado	5	0,428	0,1029			
miR-29a	Controle	5	1	0	0,0817	Teste-t não pareado	0,0047
	Tratado	5	1,386	0,09976			
miR-182	Controle	5	1	0			

	Tratado	5	0,05728	0,02854	0,0011	Teste Mann-Whitney	0,0079
miR-195	Controle	5	1	0			
	Tratado	5	0,6396	0,04412	0,008	Teste Mann-Whitney	0,0079
miR-184	Controle	5	1	0			
	Tratado	5	0,7992	0,03496	0,0117	Teste Mann-Whitney	0,0079
miR-9	Controle	5	1	0			
	Tratado	5	0,8072	0,03428	0,0008	Teste Mann-Whitney	0,0079
miR-96	Controle	4	1	0			
	Tratado	5	5,885	3,294	0,0113	Teste Mann-Whitney	0,0079
miR-204	Controle	5	1	0			
	Tratado	5	0,4612	0,1747	0,0596	Teste-t não pareado	0,015
miR-152	Controle	5	1	0			
	Tratado	5	1,775	0,3069	0,1266	Teste-t não pareado	0,0356
miR-130b	Controle	5	1	0			
	Tratado	5	1,332	0,1397	0,0728	Teste-t não pareado	0,0447
miR-130a	Controle	5	1	0			
	Tratado	5	0,9084	0,03889	0,0909	Teste-t não pareado	0,0463
U87	Controle	5	1	0			
	Tratado	5	2,12	0,4761	0,0777	Teste-t não pareado	0,0465
miR-30d	Controle	4	1	0			
	Tratado	4	0,8533	0,06166	0,2957	Teste-t não pareado	0,0548
miR-335	Controle	5	1	0			
	Tratado	5	6,852	3,006	0,0800	Teste-t não pareado	0,0874
miR-21	Controle	5	1	0			
	Tratado	5	476,1	276,9	0,0670	Teste-t não pareado	0,1245
miR-30a	Controle	5	1	0			
	Tratado	5	0,8476	0,1101	0,0015	Teste Mann-Whitney	0,127
miR-30b	Controle	5	1	0			
	Tratado	5	2,813	1,96	0,0002	Teste Mann-Whitney	0,127
miR-375	Controle	5	1	0			
	Tratado	5	2,178	1,374	0,0002	Teste Mann-Whitney	0,127
miR-322	Controle	5	1	0			
	Tratado	5	2,138	0,7116	0,0853	Teste-t não pareado	0,1485
miR-218	Controle	5	1	0			
	Tratado	5	0,9454	0,07979	0,0899	Teste-t não pareado	0,5131

Tabela S3: Tabela dos valores obtidos do teste de Shapiro Wilk, Teste T não pareado e Teste de Mann-Whitney, sendo os valores com diferença estatística significativa, o $p < 0,05$.

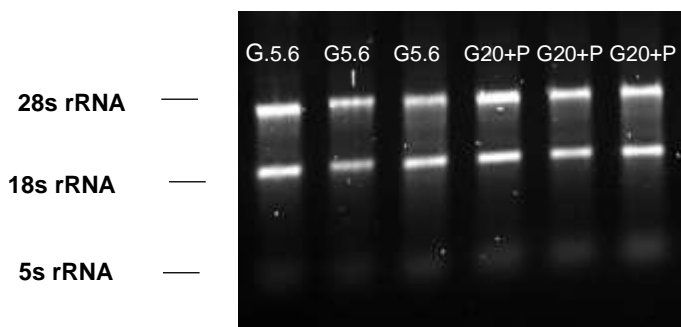


Figura S1: Eletroforese de gel de amostras de RNA total obtidos de células secretoras de insulina INS1-E do grupo controle (Glicose 5.6 mM) e tratado (Glicose 20 mM e palmitato 0,1 mM) em três experimentos independentes. Nas amostras controle e tratado são mostradas as bandas que representam os RNA ribossômicos (rRna) 28s, 18s e 5s, indicando a integridade das amostras.

9.3 Curva de Amplificação

O PCR-RT é uma técnica que consiste na detecção e amplificação de cDNAs de amostras. A cada ciclo de reações (desnaturação, anelamento e extensão), os CDNAs são amplificados e, assim, é emitida uma fluorescência. Geralmente, o PCR-RT ocorre até 40 ciclos e a amplificação ocorre de maneira exponencial de forma que é possível delinear uma curva em um gráfico. Os gráficos abaixo mostram as curvas de amplificação das amostras, o que demonstra que genes alvos foram amplificados através da detecção em tempo real da intensidade da fluorescência (FAM) ciclo a ciclo (**Figura S2-S6**). Além disso, é apresentado uma tabela com os valores do CT (ciclo de *threshold*) dos genes amplificados e não amplificados (**Tabela S4-S8**). Geralmente, o CT de corte ou limite recomendado é até 38 ($Ct \leq 38$), ou seja, que a partir deste valor o sinal não é confiável, não sendo possível detectar o alvo (ThermoFisher, 2012).

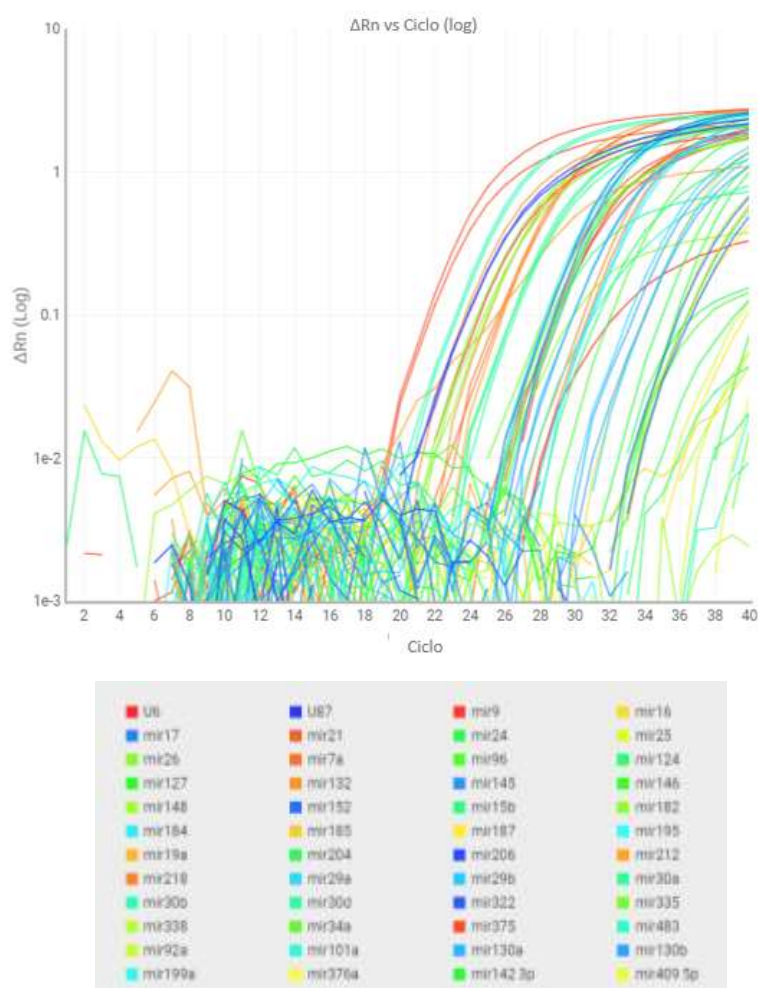


Figura S2: Curva de amplificação dos miRNAs do primeiro experimento obtida pelo programa da Thermo Fisher Scientific®. Figura adaptada de Thermo Fisher Scientific Apps <<https://apps.thermofisher.com/>>. Legendas: Legenda dos microRNAs e a suas respectivas cores representadas pelas linhas no gráfico de amplificação.

Amostra	Alvo	Média CT	Amostra	Alvo	Média CT	Amplificação status
Controle	miR130a	30.514	Tratado	miR130a	30.547	Amp
Controle	miR130b	34.664	Tratado	miR130b	33.971	Amp
Controle	miR132	25.334	Tratado	miR132	24.008	Amp
Controle	miR15b	25.719	Tratado	miR15b	28.067	Amp
Controle	miR182	23.781	Tratado	miR182	28.141	Amp
Controle	miR184	32.101	Tratado	miR184	32.246	Amp
Controle	miR187	35.0	Tratado	miR187	38.045	Amp
Controle	miR195	29.244	Tratado	miR195	29.411	Amp
Controle	miR19a	-	Tratado	miR19a	36.597	Amp
Controle	miR204	30.053	Tratado	miR204	34.486	Amp
Controle	miR21	29.173	Tratado	miR21	28.772	Amp

Controle	miR212	25.631	Tratado	miR212	26.86	Amp
Controle	miR24	35.11	Tratado	miR24	36.872	Amp
Controle	miR25	39.305	Tratado	miR25	37.63	Amp
Controle	miR26	25.131	Tratado	miR26	25.557	Amp
Controle	miR29a	34.349	Tratado	miR29a	33.464	Amp
Controle	miR30a	30.101	Tratado	miR30a	30.253	Amp
Controle	miR30b	24.0	Tratado	miR30b	24.153	Amp
Controle	miR142 3p	34.804	Tratado	miR142 3p	33.9	Amp
Controle	miR152	29.376	Tratado	miR152	29.023	Amp
Controle	miR218	31.918	Tratado	miR218	31.615	Amp
Controle	miR30d	26.206	Tratado	miR30d	26.39	Amp
Controle	miR322	35.047	Tratado	miR322	35.64	Amp
Controle	miR335	27.787	Tratado	miR335	27.416	Amp
Controle	miR375	22.002	Tratado	miR375	22.208	Amp
Controle	miR483	29.381	Tratado	miR483	-	Amp
Controle	miR7a	27.013	Tratado	miR7a	26.895	Amp
Controle	miR9	29.494	Tratado	miR9	29.416	Amp
Controle	miR96	39.858	Tratado	miR96	32.545	Amp
Controle	U87	23.256	Tratado	U87	23.249	Amp
Controle	U6	23.342	Tratado	U6	30.066	Amp
Controle	mir101a	-	Tratado	mir101a	-	No Amp
Controle	mir124	-	Tratado	mir124	-	No Amp
Controle	mir127	-	Tratado	mir127	-	No Amp
Controle	mir145	-	Tratado	mir145	-	No Amp
Controle	mir146	-	Tratado	mir146	-	No Amp
Controle	mir148	-	Tratado	mir148	-	No Amp
Controle	miR16	-	Tratado	miR16	34.971	No Amp
Controle	mir17	-	Tratado	mir17	-	No Amp
Controle	mir185	-	Tratado	mir185	-	No Amp
Controle	mir206	-	Tratado	mir206	-	No Amp
Controle	mir199a	-	Tratado	mir199a	-	No Amp
Controle	miR338	-	Tratado	miR338	35.602	No Amp
Controle	mir34a	-	Tratado	mir34a	-	No Amp
Controle	mir376a	-	Tratado	mir376a	-	No Amp
Controle	mir409 5p	-	Tratado	mir409 5p	-	No Amp

Tabela S4: Tabela de amplificação do Array dos miRNAs do grupo controle e tratado do primeiro experimento. (CT: Ciclo do *Threshold*, Amp: Amplificado e No Amp: Não amplificado).

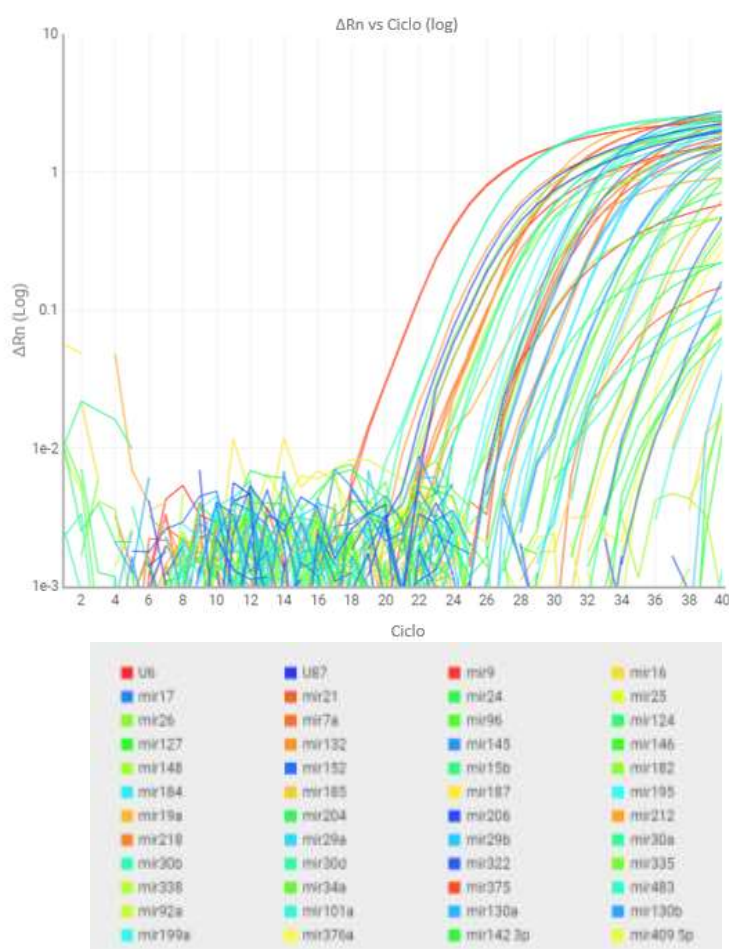


Figura S3 e Legenda: Curva de amplificação dos miRNAs do segundo experimento obtida pelo programa da Thermo Fisher Scientific®. Adaptado de Thermo Fisher Scientific Apps <<https://apps.thermofisher.com/>>. **Legendas:** Legenda dos microRNAs e a suas respectivas cores representadas pelas linhas no gráfico de amplificação.

Amostra	Alvo	Média CT	Amostra	Alvo	Média CT	Amplificação status
Controle	miR130a	31.286	Tratado	miR130a	31.306	Amp
Controle	miR130b	33.329	Tratado	miR130b	33.315	Amp
Controle	miR132	26.388	Tratado	miR132	24.553	Amp
Controle	miR152	30.234	Tratado	miR152	29.321	Amp
Controle	miR15b	25.856	Tratado	miR15b	30.949	Amp
Controle	miR182	25.131	Tratado	miR182	28.179	Amp
Controle	miR184	32.653	Tratado	miR184	32.724	Amp
Controle	miR195	28.828	Tratado	miR195	29.402	Amp
Controle	miR204	30.771	Tratado	miR204	33.163	Amp
Controle	miR21	38.694	Tratado	miR21	29.635	Amp

Controle	miR212	25.81	Tratado	miR212	27.893	Amp
Controle	miR218	31.858	Tratado	miR218	31.968	Amp
Controle	miR24	35.823	Tratado	miR24	37.797	Amp
Controle	miR26	25.613	Tratado	miR26	26.106	Amp
Controle	miR29a	34.763	Tratado	miR29a	34.446	Amp
Controle	miR30a	30.072	Tratado	miR30a	30.658	Amp
Controle	miR30b	24.479	Tratado	miR30b	24.477	Amp
Controle	miR30d	26.388	Tratado	miR30d	26.818	Amp
Controle	miR322	38.0	Tratado	miR322	35.984	Amp
Controle	miR335	32.017	Tratado	miR335	27.909	Amp
Controle	miR338	39.451	Tratado	miR338	36.676	Amp
Controle	miR375	22.118	Tratado	miR375	22.148	Amp
Controle	miR483	34.124	Tratado	miR483	35.008	Amp
Controle	miR7a	27.358	Tratado	miR7a	27.323	Amp
Controle	miR9	29.525	Tratado	miR9	29.87	Amp
Controle	miR96	34.393	Tratado	miR96	33.559	Amp
Controle	U87	24.243	Tratado	U87	23.835	Amp
Controle	U6	24.820	Tratado	U6	29.212	Amp
Controle	mir101a	-	Tratado	mir101a	-	No Amp
Controle	mir124	-	Tratado	mir124	-	No Amp
Controle	mir127	-	Tratado	mir127	-	No Amp
Controle	miR142 3p	-	Tratado	miR142 3p	34.615	No amp
Controle	mir145	-	Tratado	mir145	-	No Amp
Controle	mir146	-	Tratado	mir146	-	No Amp
Controle	mir148	-	Tratado	mir148	-	No Amp
Controle	miR16	-	Tratado	miR16	35.576	No Amp
Controle	mir17	-	Tratado	mir17	-	No Amp
Controle	mir185	-	Tratado	mir185	-	No Amp
Controle	miR187	35.617	Tratado	miR187	-	No Amp
Controle	mir199a	-	Tratado	mir199a	-	No Amp
Controle	miR19a	-	Tratado	miR19a	36.125	No Amp
Controle	mir206	-	Tratado	mir206	-	No Amp
Controle	miR25	-	Tratado	miR25	38.429	No Amp
Controle	mir34a	-	Tratado	mir34a	-	No Amp
Controle	mir376a	-	Tratado	mir376a	-	No Amp
Controle	mir409 5p	-	Tratado	mir409 5p	-	No Amp

Tabela S5: Tabela de amplificação do Array dos miRNAs do grupo controle e tratado do segundo experimento. (CT: Ciclo do *Threshold*, Amp: Amplificado e No Amp: Não amplificado).

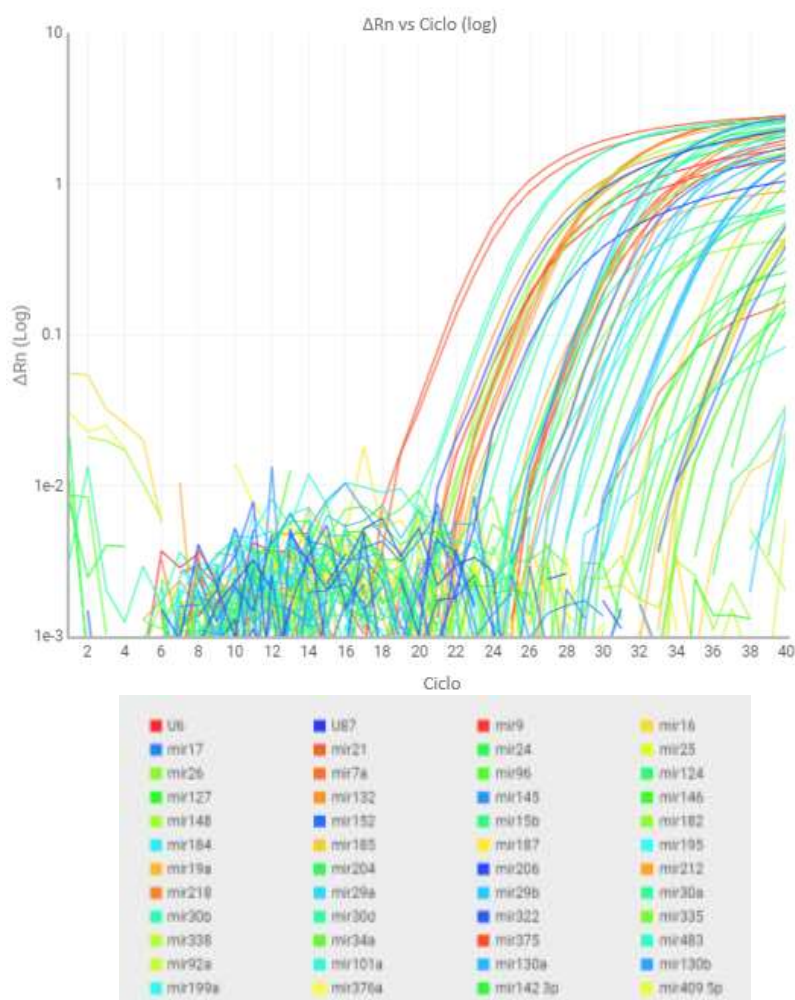


Figura S4 e Legenda: Curva de amplificação dos miRNAs do terceiro experimento obtida pelo programa da Thermo Fisher Scientific®. Adaptado de Thermo Fisher Scientific Apps <<https://apps.thermofisher.com/>>. **Legendas:** Legenda dos microRNAs e a suas respectivas cores representadas pelas linhas no gráfico de amplificação.

Amostra	Alvo	Média CT	Amostra	Alvo	Média CT	Amplificação status
Controle	miR130a	30.985	Tratado	miR130a	31.489	Amp
Controle	miR130b	34.12	Tratado	miR130b	33.98	Amp
Controle	miR132	25.498	Tratado	miR96	33.026	Amp
Controle	miR142 3p	38.0	Tratado	miR142 3p	34.262	Amp
Controle	miR152	30.356	Tratado	miR132	24.388	Amp
Controle	miR15b	25.652	Tratado	miR15b	28.059	Amp

Controle	miR182	23.709	Tratado	miR152	29.079	Amp
Controle	miR184	32.363	Tratado	miR182	28.276	Amp
Controle	miR187	35.422	Tratado	miR184	32.904	Amp
Controle	miR195	28.568	Tratado	miR195	29.54	Amp
Controle	miR19a	37.278	Tratado	miR19a	36.941	Amp
Controle	miR204	32.455	Tratado	miR204	33.399	Amp
Controle	miR21	37.828	Tratado	miR21	29.111	Amp
Controle	miR212	25.561	Tratado	miR212	27.987	Amp
Controle	miR218	30.921	Tratado	miR218	31.484	Amp
Controle	miR24	34.922	Tratado	miR24	36.652	Amp
Controle	miR26	25.382	Tratado	miR25	36.634	Amp
Controle	miR29a	33.98	Tratado	miR29a	33.868	Amp
Controle	miR30a	29.954	Tratado	miR30a	30.355	Amp
Controle	miR30b	24.117	Tratado	miR30b	24.341	Amp
Controle	miR30d	30.583	Tratado	miR30d	26.507	Amp
Controle	miR322	35.897	Tratado	miR322	36.525	Amp
Controle	miR335	30.841	Tratado	miR335	27.647	Amp
Controle	miR338	36.612	Tratado	miR338	36.457	Amp
Controle	miR375	21.763	Tratado	miR375	22.048	Amp
Controle	miR483	29.809	Tratado	miR483	35.838	Amp
Controle	miR7a	26.725	Tratado	miR7a	26.89	Amp
Controle	miR9	29.013	Tratado	miR9	29.428	Amp
Controle	miR96	36.287	Tratado	miR26	26.083	Amp
Controle	U87	25.487	Tratado	U87	23.772	Amp
Controle	U6	25,03	Tratado	U6	24,9	Amp
Controle	mir101a	-	Tratado	mir101a	-	No Amp
Controle	mir124	-	Tratado	mir124	-	No Amp
Controle	mir127	-	Tratado	mir127	-	No Amp
Controle	mir145	-	Tratado	mir145	-	No Amp
Controle	mir146	-	Tratado	mir146	-	No Amp
Controle	mir148	-	Tratado	mir148	-	No Amp
Controle	miR16	-	Tratado	miR16	35.812	No Amp
Controle	mir17	-	Tratado	mir17	-	No Amp
Controle	mir185	-	Tratado	mir185	-	No Amp
Controle	mir199a	-	Tratado	mir199a	-	No Amp
Controle	mir206	-	Tratado	mir206	-	No Amp
Controle	mir34a	-	Tratado	mir34a	-	No Amp
Controle	mir376a	-	Tratado	mir376a	-	No Amp
Controle	mir409 5p	-	Tratado	mir409 5p	-	No Amp
Controle	miR25	-	Tratado	miR25	-	No Amp

Tabela S6: Tabela de amplificação do Array dos miRNAs do grupo controle e tratado do terceiro experimento (CT: Ciclo do *Threshold*, Amp: Amplificado e No Amp: Não amplificado).

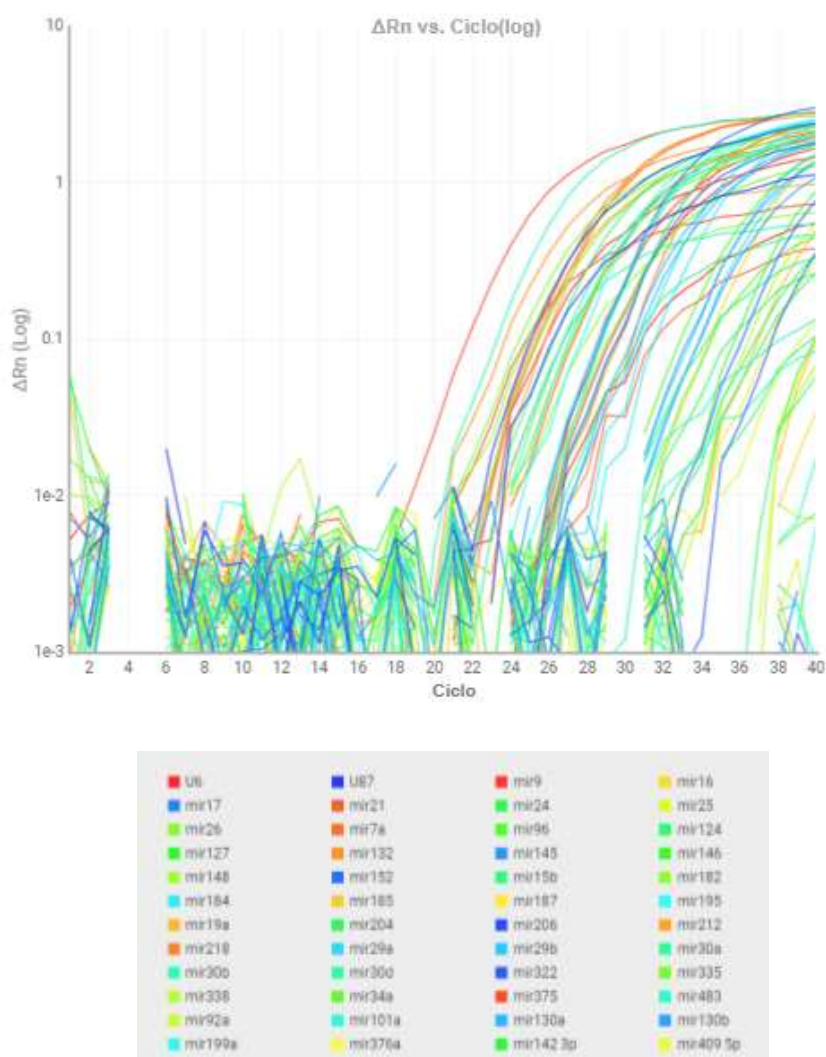


Figura S5 e Legenda: Curva de amplificação dos miRNAs do quarto experimento obtida pelo programa da Thermo Fisher Scientific®. Adaptado de Thermo Fisher Scientific Apps <<https://apps.thermofisher.com/>>. **Legendas:** Legenda dos microRNAs e a suas respectivas cores representadas pelas linhas nos gráficos de amplificação.

Amostra	Alvo	Média CT	Amostra	Alvo	Média CT	Amplificação o status
Controle	mir21	34.491	Tratado	mir21	28.489	Amp
Controle	mir30b	25.293	Tratado	mir30b	22.133	Amp
Controle	mir375	23.261	Tratado	mir375	20.575	Amp
Controle	mir335	29.223	Tratado	mir335	27.264	Amp
Controle	mir132	25.709	Tratado	mir132	24.086	Amp
Controle	mir322	38,000	Tratado	mir322	36,41	Amp
Controle	U-87	25.501	Tratado	U-87	24.514	Amp

Controle	mir96	33.403	Tratado	mir96	32.114	Amp
Controle	mir152	30.401	Tratado	mir152	29.555	Amp
Controle	mir130b	34.655	Tratado	mir130b	34.056	Amp
Controle	mir29a	35.043	Tratado	mir29a	34.615	Amp
Controle	mir7a	26.736	Tratado	mir7a	26.989	Amp
Controle	mir130a	31,113	Tratado	mir130a	31,45	Amp
Controle	mir30d	27.573	Tratado	mir30d	27.895	Amp
Controle	mir24	35.358	Tratado	mir24	35.775	Amp
Controle	mir218	30.615	Tratado	mir218	31.196	Amp
Controle	mir184	32,399	Tratado	mir184	33,06	Amp
Controle	mir9	28,96	Tratado	mir9	29,618	Amp
Controle	mir30a	29,92	Tratado	mir30a	30,724	Amp
Controle	mir195	28.974	Tratado	mir195	29.923	Amp
Controle	mir204	32.452	Tratado	mir204	33.651	Amp
Controle	mir26	25.307	Tratado	mir26	26.296	Amp
Controle	mir212	26.064	Tratado	mir212	27.136	Amp
Controle	mir483	34,21	Tratado	mir483	36,535	Amp
Controle	mir182	24.311	Tratado	mir182	27.133	Amp
Controle	mir15b	25.211	Tratado	mir15b	29.214	Amp
Controle	U6	24.675	Tratado	U6	29440	Amp
Controle	mir16	-	Tratado	mir16	35.755	No Amp
Controle	mir17	-	Tratado	mir17	-	No Amp
Controle	mir25	-	Tratado	mir25	-	No Amp
Controle	mir124	-	Tratado	mir124	-	No Amp
Controle	mir127	-	Tratado	mir127	-	No Amp
Controle	mir145	-	Tratado	mir145	-	No Amp
Controle	mir146	-	Tratado	mir146	-	No Amp
Controle	mir148	-	Tratado	mir148	-	No Amp
Controle	mir185	-	Tratado	mir185	-	No Amp
Controle	mir187	38.0	Tratado	mir187	-	No Amp
Controle	mir206	-	Tratado	mir206	-	No Amp
Controle	mir338	-	Tratado	mir338	36,061	No Amp
Controle	mir101a	-	Tratado	mir101a	-	No Amp
Controle	mir142_3	-	Tratado	mir142_3	-	No Amp
Controle	p	-	Tratado	p	36,181	No Amp
Controle	mir199a	-	Tratado	mir199a	-	No Amp
Controle	mir19a	-	Tratado	mir19a	38.0	No Amp
Controle	mir29b	-	Tratado	mir29b	-	No Amp
Controle	mir34a	-	Tratado	mir34a	-	No Amp
Controle	mir376a	-	Tratado	mir376a	-	No Amp
Controle	mir409_5	-	Tratado	mir409_5	-	No Amp
Controle	p	-	Tratado	p	-	No Amp
Controle	mir92a	-	Tratado	mir92a	-	No Amp

Tabela S7: Tabela de amplificação do Array dos miRNAs do grupo controle e tratado do quarto experimento. (CT: Ciclo do *Threshold*, Amp: Amplificado e No Amp: Não amplificado).

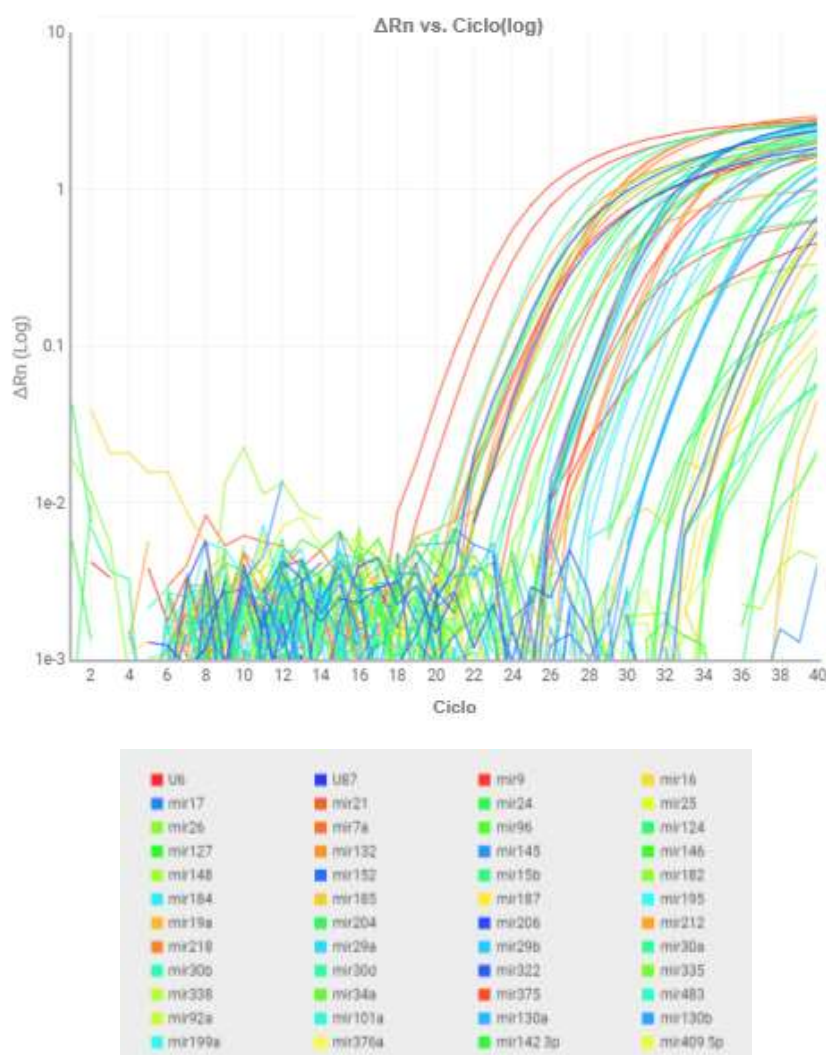


Figura S6 e Legenda: Curva de amplificação dos miRNAs do quinto experimento obtida pelo programa da Thermo Fisher Scientific®. Adaptado de Thermo Fisher Scientific Apps <<https://apps.thermofisher.com/>>. **Legendas:** Legenda dos microRNAs e as suas respectivas cores representadas pelas linhas no gráfico de amplificação.

Amostra	Alvo	Média CT	Amostra	Alvo	Média CT	Amplicação Status
Controle	mir338	39.654	Tratado	mir338	36.083	Amp
Controle	mir21	27.974	Tratado	mir21	26.035	Amp
Controle	mir142_3		Tratado	mir142_3		
Controle	p	38	Tratado	p	35,584	Amp
Controle	mir132	25.537	Tratado	mir132	24.154	Amp
Controle	mirU87	25.392	Tratado	mirU87	24.488	Amp
Controle	mir322	38	Tratado	mir322	37,403	Amp
Controle	mir335	28.364	Tratado	mir335	28.342	Amp

Controle	mir30a	29,857	Tratado	mir30a	29,88	Amp
Controle	mir29a	34,41	Tratado	mir29a	34,447	Amp
Controle	mir130b	33.987	Tratado	mir130b	34.085	Amp
Controle	mir218	30,958	Tratado	mir218	31,13	Amp
Controle	mir96	33.696	Tratado	mir96	33.951	Amp
Controle	mir204	33.976	Tratado	mir204	34.308	Amp
Controle	mir152	29.716	Tratado	mir152	30.027	Amp
Controle	mir130a	31	Tratado	mir130a	31,37	Amp
Controle	mir7a	26.266	Tratado	mir7a	26.628	Amp
Controle	mir30d	26,99	Tratado	mir30d	27,404	Amp
Controle	mir184	32.323	Tratado	mir184	33.139	Amp
Controle	mir9	29.077	Tratado	mir9	29.825	Amp
Controle	mir30b	24.578	Tratado	mir30b	25.484	Amp
Controle	mir195	28.973	Tratado	mir195	30.153	Amp
Controle	mir26	25.363	Tratado	mir26	26.416	Amp
Controle	mir187	36.425	Tratado	mir187	37.961	Amp
Controle	mir375	22.007	Tratado	mir375	22.965	Amp
Controle	mir212	25.638	Tratado	mir212	27.055	Amp
Controle	mir24	35.902	Tratado	mir24	39.569	Amp
Controle	mir15b	25.607	Tratado	mir15b	28.563	Amp
Controle	U6	23.999	Tratado	U6	30.237	Amp
Controle	mir182	23.052	Tratado	mir182	29.317	Amp
Controle	mir16	-	Tratado	mir16	38.0	No Amp
Controle	mir17	-	Tratado	mir17	-	No Amp
Controle	mir25	-	Tratado	mir25	38	No Amp
Controle	mir124	-	Tratado	mir124	-	No Amp
Controle	mir127	-	Tratado	mir127	-	No Amp
Controle	mir145	-	Tratado	mir145	-	No Amp
Controle	mir146	-	Tratado	mir146	-	No Amp
Controle	mir148	-	Tratado	mir148	-	No Amp
Controle	mir185	-	Tratado	mir185	-	No Amp
Controle	mir206	-	Tratado	mir206	-	No Amp
Controle	mir483	31,835	Tratado	mir483	-	No Amp
Controle	mir101a	38	Tratado	mir101a	-	No Amp
Controle	mir199a	-	Tratado	mir199a	-	No Amp
Controle	mir19a	-	Tratado	mir19a	38	No Amp
Controle	mir29b	-	Tratado	mir29b	-	No Amp
Controle	mir34a	-	Tratado	mir34a	-	No Amp
Controle	mir376a	-	Tratado	mir376a	-	No Amp
	mir409_5			mir409_5		
Controle	p	-	Tratado	p	-	No Amp
Controle	mir92a	-	Tratado	mir92a	-	No Amp

Tabela S8: Tabela de amplificação do Array dos miRNAs do grupo controle e tratado do quinto experimento. (CT: Ciclo do *Threshold*, Amp: Amplificado e No Amp: Não amplificado).

9.4 Avaliação de genes candidatos endógenos como controle da expressão génica.

O gene controle endógeno ideal deve possuir um nível de transcrição génica constante em diferentes condições experimentais e ser suficientemente abundante em diferentes tecidos e tipos celulares. O gene U6 e o U87, geralmente, são os mais utilizados como *housekeeping* em experimentos de expressão génica PCR-RT em células beta pancreáticas. Contudo, esses genes apresentaram variação significativa de expressão em nossos experimentos entre os grupos controles e tratados. Para a escolha do gene controle, o CT do valor do tratado foi normalizado pelo controle em todos os genes expressos e todas as amostras (n=5). O gene candidato que apresentou menor variação de expressão (média, diferença da média) e cuja diferença não foi significativa estatisticamente foi o miR-7a (Tabela S9). Dessa forma, este gene foi eleito como endógeno controle para avaliação da expressão génica dos miRNAs via PCR-RT array. Qualquer gene expresso de forma estável sob as condições experimentais definidas pode servir como um gene de normalização (Davoren et al., 2008; Thermofisher, 2012).

Genes Candidatos	Normalização (CT)	DM e EP	Valor de p
mir7a	1,004283649	0,004284 ± 0,003520	0,2583
U87	0,9684497	-0,03155 ± 0,01158	*0,0261
U6	1,182572534	0,1826 ± 0,05124	*0,0074

Tabela S9: Tabela dos Genes Candidatos a Endógeno. O gene candidato que apresentou menor variação de expressão (média, diferença da média) e cuja diferença não foi significativa estatisticamente foi o miR-7a, sendo escolhido como controle endógeno. (DM: Diferença da media EP: Erro padrão CT: Ciclo do Threshold, * = p < 0,05; n=5.).

