

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

BRUNO RAFAEL VIRGINIO DE SOUSA

**RETINOPATIA DIABÉTICA: INFLUÊNCIA DO PERFIL DE METILAÇÃO DO
MICRORNA-9-3, NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA, CONSUMO ALIMENTAR E
DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS**

JOÃO PESSOA

2024

BRUNO RAFAEL VIRGINIO DE SOUSA

**RETINOPATIA DIABÉTICA: INFLUÊNCIA DO PERFIL DE METILAÇÃO DO
MICRORNA-9-3, NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA, CONSUMO ALIMENTAR E
DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências da Nutrição,
Centro de Ciências da Saúde, Universidade
Federal da Paraíba em cumprimento a parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências da Nutrição.

Orientadora: Dr^a. Darlene Camati Persuhn

JOÃO PESSOA
2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S725r Sousa, Bruno Rafael Virginio de.

Retinopatia diabética : influência do perfil de metilação do microRNA-9-3, nível de atividade física, consumo alimentar e de parâmetros bioquímicos / Bruno Rafael Virginio de Sousa. - João Pessoa, 2024.
133 f. : il.

Orientação: Darlene Camati Persuhn.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Nutrição. 2. Retinopatia diabética. 3. Epigenética. 4. MicroRNAs. 5. Metilação do DNA. I. Persuhn, Darlene Camati. II. Título.

UFPB/BC

CDU 612.39(043)

BRUNO RAFAEL VIRGINIO DE SOUSA

**RETINOPATIA DIABÉTICA: INFLUÊNCIA DO PERFIL DE METILAÇÃO
DO MICRORNA-9-3, NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA, CONSUMO
ALIMENTAR E DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS**

Tese apresentada em 20/09/2024

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente
DARLENE CAMATI PERSUHN
Data: 29/10/2024 12:32:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Darlene Camati Persuhn
Presidenta da Banca Examinadora (DBM/CCEN/UFPB)



Documento assinado digitalmente
RAFAELA LIRA FORMIGA CAVALCANTI DE LIMA
Data: 29/10/2024 11:28:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Rafaela Lira Formiga Cavalcanti de Lima
Examinadora interna (DNUT/CCS/UFPB)



Documento assinado digitalmente
VINICIUS JOSE BACCIN MARTINS
Data: 29/10/2024 07:42:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Vinicius José Baccin Martins
Examinador interno (DNUT/CCS/UFPB)



Documento assinado digitalmente
FABIANE GOMES DE MORAES REGO
Data: 24/10/2024 12:00:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego
Examinadora externo (DAC/UFPR)



Documento assinado digitalmente
GERALDO PICHETH
Data: 29/10/2024 15:22:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Geraldo Picheth
Examinador externo (DAC/UFPR)

Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves
Examinador interno Suplente (DNUT/CCS/UFPB)

Profa. Dra. Maria Da Conceicao Rodrigues Goncalves
Examinador interno Suplente (DNUT/CCS/UFPB)

Prof. Dra. Lydiane de Lima Tavares Toscano
Examinador externo Suplente (UNINASSAU-JP)

Prof. Dra. Rafaella Cristhine Pordeus Luna
Examinador externo Suplente (DNUT/UFPB)

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a Deus, pelo dom da vida estando sempre presente para conclusão deste trabalho; a minha esposa, aos meus pais e meus irmãos pelo amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois foi ELE quem me deu o dom de estudar, pesquisar e, sem ELE, nada valeria a pena. A ELE, que preparou a realização desse grande sonho. Sem Ele, nada disso seria possível.

Aos meus pais, Beltrano e Neide, que me concederam a vida e me ensinaram a viver com dignidade, respeito e humildade. À minha mãe, especialmente, que desde sempre esteve presente, dando todo o apoio necessário para tornar essa caminhada mais fácil. Serei eternamente grato pelos incontáveis dias dedicados a mim em busca desse sonho.

À minha esposa, Orrana, por ser uma companheira incrível, que está sempre ao meu lado, me dando apoio na condução e realização deste objetivo. Sou grato a Deus por colocá-la em minha vida e por poder compartilhar este ciclo com ela.

Aos meus irmãos, Benildo e Bárbara, por sempre me apoiarem na busca desse sonho. Sou grato por suas vidas, por serem pessoas de tamanha bondade e irmãos inspiradores.

Aos meus avós (in memoriam), João Virgínio e Elvira, que certamente estão me olhando e felizes por mais essa conquista.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Darlene Camati Persuhn, por todo o apoio durante essa jornada. Sou extremamente grato por ela ter aberto as portas de seu laboratório (LEMAC) e por ter confiado em minhas capacidades. Agradeço pela sabedoria ao conduzir este trabalho com extrema qualidade, zelo e honestidade, pela paciência, dedicação e incentivos em sempre me impulsionar a ser um pesquisador melhor.

Aos membros da banca, grandes pesquisadores, que aceitaram cordialmente o convite e contribuíram grandiosamente para a conclusão deste trabalho.

Aos pacientes/voluntários que aceitaram participar desta pesquisa, pois é para eles todo esse trabalho, com o intuito de melhorar, futuramente, o prognóstico das pessoas que possuem diabetes e/ou retinopatia diabética.

Ao Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW), em especial à coordenação de endocrinologia e metabologia e à unidade da visão.

Às minhas companheiras de laboratório, Caroline Severo e Tainá Diniz, que se dedicaram com muito empenho a este trabalho em equipe muito bonito. Agradeço por doarem um pouco de seu tempo e fazerem com que este trabalho acontecesse da melhor forma possível.

Aos servidores técnicos do DBM, Bosco Carlos, Diones e César, pelo atendimento sempre cordial e extremamente atencioso.

Aos técnicos de laboratório, Silvia, João e Vania, por sempre se disponibilizarem a

auxiliar e facilitar a execução dos experimentos no DBM.

Ao Laboratório Medlab, por abrir as portas para a realização das análises bioquímicas, em especial às pessoas de Herbert, Luciana, Diego e à enfermeira Débora.

Ao Prof. Dr. Alexandre Sérgio Silva, pela parceria científica de longa data com nosso laboratório.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, na pessoa do Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves e Dr. Vinicius Bacim Martins, e aos secretários, Carlos Fernando e Marcos, pelo atendimento sempre cordial e atencioso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ), pelo apoio e incentivo às pesquisas.

Aos membros e ex-membros do laboratório LEMAC, pela convivência durante esta etapa de minha vida. À todos, muito obrigado.

“Em todas as circunstâncias, dai graças,
porque esta é a vossa respeito a vontade de
Deus em Jesus Cristo”

I Tessalonicenses 5:18

RESUMO

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é um distúrbio metabólico que causa hiperglicemia persistente devido à produção insuficiente de insulina ou falhas em sua ação. Essa hiperglicemia está relacionada a complicações crônicas, incluindo microvasculares e macrovasculares, sendo a retinopatia diabética (RD) uma complicação microvascular comum, representando um risco significativo de cegueira. Há um interesse crescente na identificação de marcadores para detectar precocemente pacientes diabéticos em risco de desenvolver RD. A epigenética, em especial a metilação do DNA, tem sido explorada no estudo das complicações crônicas do DM2. A expressão do miR-9 pode ser regulada pela metilação do DNA, e estudos anteriores indicaram uma associação entre o perfil metilado do promotor do miR-9 e a RD. No entanto, esses estudos não examinaram a relação da metilação com estágios clínicos da retinopatia nem fatores modificáveis como atividade física, dieta e estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi analisar o perfil de metilação do miR-9-3 em pacientes com DM2, com e sem RD, e comparar os estágios da complicação com parâmetros físicos, dietéticos e bioquímicos. Um estudo transversal foi realizado com 170 participantes, divididos em um grupo controle (DM2, n = 64) e um grupo RD (n = 106), subdividido em retinopatia diabética não proliferativa (RDNP, n = 58) e retinopatia diabética proliferativa (RDP, n = 48). Foram analisados parâmetros epidemiológicos, clínicos, antropométricos, nível de atividade física (NAF), consumo alimentar e bioquímicos. O DNA extraído de leucócitos foi utilizado para analisar a metilação do miR-9-3 por meio de PCR-MSP. Os resultados mostraram que o perfil hipermetilado do miR-9-3 foi significativamente mais frequente no grupo RD ($p = 0,001$) e no subgrupo RDP em comparação ao grupo controle ($p = 0,001$). A regressão logística revelou que a hipermetilação do miR-9-3 aumentou as chances de desenvolver RD (OR: 2,826; $p = 0,002$) e RDP (OR: 5,472; $p = 0,001$). Além disso, a hipermetilação nos grupos RD e RDNP foi associada a níveis séricos elevados de VEGF-A ($p = 0,012$ e $p = 0,025$, respectivamente). A NAF insuficiente foi um fator de risco significativo para a metilação do miR-9-3 (OR = 2,592; $p = 0,006$), enquanto uma maior capacidade antioxidante total (CAT) foi identificada como variável protetora (OR = 0,409; $p = 0,018$). A ingestão de carboidratos (kcal) foi um fator de risco independente para a metilação do miR-9-3 (OR = 5,243; $p = 0,000$). Esses dados indicam que a hipermetilação do miR-9-3 está associada ao desenvolvimento e progressão da RD, especialmente na forma proliferativa, possivelmente devido à sua ligação com níveis elevados de VEGF-A e angiogênese patológica. Além disso, a NAF insuficiente é um fator de risco para a hipermetilação, enquanto uma maior CAT atua como fator protetor, sugerindo que intervenções em atividade física e estado antioxidante podem ser eficazes na prevenção. Por fim, a associação entre a ingestão de carboidratos e a metilação do miR-9-3 sugere que a dieta pode impactar complicações microvasculares, destacando a importância de intervenções dietéticas no manejo da RD.

Palavras-chave: Retinopatia diabética, Epigenética, microRNAs, Metilação, Atividade Física, Estresse Oxidativo, Ingestão dietética

ABSTRACT

Diabetes mellitus type 2 (DM2) is a metabolic disorder that causes persistent hyperglycemia due to insufficient insulin production or failure in its action. This hyperglycemia is associated with chronic complications, including microvascular and macrovascular issues, with diabetic retinopathy (DR) being a common microvascular complication that represents a significant risk of blindness. There is growing interest in identifying markers to detect patients with diabetes at higher risk of developing DR early on. Epigenetics, especially DNA methylation, has been explored in studying chronic complications of DM2. The expression of miR-9 can be regulated by DNA methylation, and previous studies have indicated an association between the methylated profile of the miR-9 promoter and DR. However, these studies did not examine the relationship between methylation and clinical stages of retinopathy or modifiable factors such as physical activity, diet, and oxidative stress. The aim of this study was to analyze the methylation profile of miR-9-3 in patients with DM2, both with and without DR, and to compare the stages of the complication with physical, dietary, and biochemical parameters. A cross-sectional study was conducted with 170 participants divided into a control group (DM2, n = 64) and a DR group (n = 106), which was further subdivided into non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR, n = 58) and proliferative diabetic retinopathy (PDR, n = 48). Epidemiological, clinical, anthropometric, physical activity level (PAL), dietary intake, and biochemical parameters were analyzed. DNA extracted from leukocytes was used to analyze the methylation of miR-9-3 using MSP-PCR. The results showed that the hypermethylated profile of miR-9-3 was significantly more frequent in the DR group ($p = 0.001$) and in the PDR subgroup compared to the control group ($p = 0.001$). Logistic regression revealed that the hypermethylation of miR-9-3 increased the chances of developing DR (OR: 2.826; $p = 0.002$) and PDR (OR: 5.472; $p = 0.001$). Additionally, hypermethylation in the DR and NPDR groups was associated with elevated serum levels of VEGF-A ($p = 0.012$ and $p = 0.025$, respectively). Insufficient PAL was a significant risk factor for the methylation of miR-9-3 (OR = 2.592; $p = 0.006$), while a higher total antioxidant capacity (TAC) was identified as a protective variable (OR = 0.409; $p = 0.018$). Carbohydrate intake (kcal) was an independent risk factor for the methylation of miR-9-3 (OR = 5.243; $p = 0.000$). These data indicate that the hypermethylation of miR-9-3 is associated with the development and progression of DR, particularly in the proliferative form, possibly due to its link with elevated levels of VEGF-A and pathological angiogenesis. Moreover, insufficient PAL is a risk factor for hypermethylation, while higher TAC serves as a protective factor, suggesting that interventions in physical activity and antioxidant status may be effective in prevention. Finally, the association between carbohydrate intake and methylation of miR-9-3 suggests that diet may impact microvascular complications, highlighting the importance of dietary interventions in the management of DR.

Keywords: Diabetic retinopathy, Epigenetics, microRNAs, Methylation, Physical Activity, Oxidative Stress, Dietary Intake

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA TESE

Tabela 1. Principais miRNAs envolvidos na patogênese da Retinopatia Diabética.....	26
Tabela 2. Classificação do Índice de Massa Corporal.....	46
Tabela 3. Sequências dos iniciadores e condições da PCR específica para metilação do DNA do gene miR-9-3.....	49

TABELAS DO ARTIGO 1

Table 1 - Epidemiological, clinical, anthropometric, physical and biochemical characteristics of participants (n = 170).....	77
Table 2 - Logistic regression models verifying the influence of <i>miR-9-3</i> methylation on DR and PDR	81

TABELAS DO ARTIGO 2

Table 1 - General Characteristics of Study Participants (n = 170).....	98
Table 2 - Logistic regression models verifying the influence of Physical Activity Level on miR-9-3 methylation.....	102

TABELAS DO ARTIGO 3

Table 1 - General characteristics of study participants (n = 170).....	114
Table 2 - Dietary intake according to miR-9-3 methylation profile (n = 170).....	116
Table 3. Logistic regression models verifying the influence of Carbohydrate intake on miR-9-3 methylation.....	118

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA TESE

Figura 1: Síntese de microRNA.....	22
Figura 2: Regulação da secreção de insulina mediada por <i>mir-9</i>	31
Figura 3: Mecanismo proposto sobre a relação entre miR-9-3 e VEGF.....	33
Figura 4: Desenho do estudo.....	44
Figura 5: Gel de agarose de metilação do <i>miR-9-3</i>	50

FIGURAS DO ARTIGO 1

Fig 1. miR-9-3 promoter methylation profile of participants.....	79
Fig. 2 Serum VEGF-A levels of participants according miR-9-3 methylation (n = 88).....	82

FIGURAS DO ARTIGO 2

Fig 1. miR-9-3 promoter methylation profile with representative samples of the groups studied after MSP.....	99
Fig 2. Physical Activity Levels according Methylation profile of miR-9-3.....	100
Fig 3. Plasma antioxidant activity according to the methylation profile.....	91

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 DIABETES MELLITUS E RETINOPATIA DIABÉTICA	16
2.2 EPIGENÉTICA E <i>MIR-9-3</i>	20
2.3 ATIVIDADE FÍSICA, RETINOPATIA DIABÉTICA E EPIGENÉTICA	35
2.4 CONSUMO ALIMENTAR, RETINOPATIA E EPIGENÉTICA	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 TIPO DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS.....	43
3.2 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS.....	44
3.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA DA RETINOPATIA DIABÉTICA.....	44
3.4 QUESTIONÁRIOS SOCIODEMOGRÁFICOS E AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	45
3.5 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA	45
3.6 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR	47
3.7 COLETA SANGUÍNEA E ANÁLISES BIOQUÍMICAS	47
3.8 ANÁLISE DE METILAÇÃO DO DNA.....	49
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4. RESULTADOS	51
REFERÊNCIAS.....	53
APÊNDICES	69
APÊNDICE A – ARTIGO 1	69
APÊNDICE B – ARTIGO 2.....	89
APÊNDICE C – ARTIGO 3.....	110
ANEXOS.....	123
ANEXO A – RECORDATÓRIO ALIMENTAR DE 24 HORAS	124
ANEXO B – QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR (QFA)	125
ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	128

ANEXO D – INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS.....	130
ANEXO E – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	133

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus (DM) é uma doença que atinge proporções epidêmicas com estimativa de pouco mais de meio bilhão de pessoas com DM mundialmente (International Diabetes Federation, 2021). O diabetes mellitus é um grupo de distúrbios metabólicos do metabolismo de carboidratos em que a glicose é subutilizada como fonte de energia e superproduzida devido à gliconeogênese e glicogenólise inadequadas, resultando em hiperglicemia (American Diabetes Association, 2024). Essa hiperglicemia persistente está associada a complicações crônicas microvasculares e macrovasculares, aumento de morbidade, redução da qualidade de vida e elevação da taxa de mortalidade (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2021).

Entre as complicações crônicas microvasculares, destaca-se a retinopatia diabética (RD), considerada uma complicação neurovascular específica tanto do DM1 quanto do DM2, cuja prevalência está fortemente correlacionada à duração do diabetes (Arambewela *et al.*, 2018), da hipertensão (Liu; Ma; Tong, 2020) e ao mal controle glicêmico (Monami *et al.*, 2021). RD é classificada em retinopatia não proliferativa (leve, moderada e severa) ou proliferativa, conforme o “*International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale*” (Wilkinson *et al.*, 2003).

As primeiras alterações no olho causadas pela RD são nos capilares retinianos, onde se verificam alterações microestruturais e funcionais a nível vascular e neuronal e um estado inflamatório crônico da retina (Zafar *et al.*, 2019). É nesse contexto que a hiperglicemia crônica ativa uma série de mecanismos fisiopatológicos que levam ao espessamento da membrana basal e incapacidade da barreira hemato-retiniana, favorecendo a hiperpermeabilidade vascular e o surgimento de edemas, micro-hemorragias, descolamento de retina, fibrose e neovascularização (Antonetti; Silva; Stitt, 2021).

Os fatores de risco mais relevantes para o desenvolvimento da RD são a duração da doença (Arambewela *et al.*, 2018), o controle glicêmico inadequado (níveis elevados de hemoglobina glicada (HbA1c) (Shiferaw *et al.*, 2020) e presença de hipertensão arterial (Liu *et al.*, 2020a). Outros fatores de risco para RD incluem índice de massa corporal elevado, puberdade e gravidez, bem como cirurgia de catarata (Wong *et al.*, 2016).

Há uma crescente necessidade de investigar com maior profundidade os fatores de risco para complicações do Diabetes mellitus Tipo 2 (DM2), especialmente a RD. Por ser uma complicação que além de comprometer a qualidade de vida dos pacientes e familiares (Pereira *et al.*, 2017), implica na necessidade de tratamentos que nem sempre levam à melhora ou

interrupção na progressão da doença como por exemplo: laser e injeções anti-fator de crescimento endotelial vascular (anti-VEGF) (Sankar; Sankar; Chandra, 2018), sendo assim, evidencia-se a necessidade de identificar outros marcadores precoces e estratégias eficazes de prevenção da RD especialmente prevenindo a maior severidade da doença.

Nesse sentido alguns fatores genéticos podem ser explorados, pois demonstram desempenhar um papel central na fisiopatologia da RD, com vários genes candidatos associados a progressão dessa microcomplicação (Sharma *et al.*, 2019). Ressalta-se que entre fatores genéticos e epigenéticos existe diferenciação pois, o último aborda os mecanismos que regulam a expressão gênica, mas não altera a sequência de DNA, diferente dos fatores genéticos (Berger *et al.*, 2009a). A epigenética ocorre por alguns mecanismos conhecidos, entre eles, o mais estudado dentro do contexto de doenças crônicas é a metilação de regiões de controle de expressão gênica.

Nos últimos anos, estudos têm identificado potenciais marcadores genéticos e epigenéticos, como a metilação do DNA e microRNAs, que estão associados ao DM2 e RD. Pesquisas anteriores sugerem uma relação entre o perfil de metilação dos microRNAs *miR-9-1* e *miR-9-3* com a RD (Dos Santos Nunes *et al.*, 2018; De Assis *et al.*, 2021). No entanto, essa associação ainda não foi explorada no contexto dos diferentes estágios clínicos da RD.

Além de fatores genéticos como a metilação influenciarem diretamente a RD fatores como o estresse oxidativo (Klemp *et al.*, 2022) e a atividade física (Lachin *et al.*, 2008) podem induzir alterações na expressão de microRNAs em pacientes com DM2 e DR. Estudos indicam que a atividade física pode alterar a metilação de genes, como o Receptor de Vitamina D (*VDR*) (Yu *et al.*, 2021), a Metilenotetrahidrofolato Redutase (*MTHFR*) (Diniz *et al.*, 2021) e vários miRNAs em pacientes com DM2 (Luo *et al.*, 2023). Além disso, há uma associação entre estresse oxidativo, metilação do DNA, secreção de insulina (Ma *et al.*, 2022) e a incidência de DM2. No entanto, o papel da atividade física e do estresse oxidativo na metilação do *miR-9-3* ainda não foi investigado.

O objetivo geral da tese foi analisar o perfil de metilação do *miR-9-3* em pacientes diabéticos com e sem retinopatia, comparando-o entre diferentes estágios da complicação e correlacionando-o a parâmetros físicos, de consumo alimentar e bioquímicos. Especificamente, buscou-se investigar o perfil de metilação do *miR-9-3* nos estágios clínicos da RD e avaliar a influência da atividade física, estresse oxidativo, consumo alimentar e parâmetros bioquímicos sobre essa metilação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DIABETES MELLITUS E RETINOPATIA DIABÉTICA

O Diabetes mellitus (DM) é uma Doença Crônica Não Transmissível (DCNT), multifatorial, caracterizada por um grupo de distúrbios metabólicos do metabolismo de carboidratos em que a glicose é subutilizada como fonte de energia e superproduzida devido à gliconeogênese e glicogenólise inadequadas, resultando em hiperglicemia (American Diabetes Association, 2024). Essa condição pode ser classificada principalmente em dois tipos: Diabetes mellitus Tipo 1 (DM1), que geralmente resulta de um processo autoimune que destrói as células beta pancreáticas, e DM2, que está frequentemente associado à resistência à insulina e é influenciado por fatores genéticos e ambientais, como obesidade e sedentarismo. Os sintomas iniciais geralmente incluem polidipsia, poliúria, polifagia e, eventualmente, perda de peso (Ortiz-Martínez *et al.*, 2022). O DM1 é uma doença autoimune que resulta na destruição das células β do pâncreas, onde as Ilhotas de Langerhans são atacadas pelos linfócitos T ativados, caracterizando os pacientes como insulínodpendentes. Já o DM2 é a forma mais comum da doença, representando cerca de 95% de todos os casos de diabetes mellitus. Sendo causado por uma interação de fatores genéticos e ambientais (American Diabetes Association, 2019).

Essa doença crônica desencadeia uma série de complicações com alto grau de morbidade e mortalidade, resultando em um número significativo de consultas médicas, hospitalizações, incapacidades e óbitos. Exemplos dessas complicações multissistêmicas incluem eventos microvasculares, como retinopatia, nefropatia e neuropatia, e eventos macrovasculares, incluindo doença cardíaca isquêmica, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica que podem levar a uma redução significativa na qualidade de vida dos pacientes (International Diabetes Federation, 2019).

Do ponto de vista epidemiológico, dados da *International Diabetes Federation* (IDF) indicam que, em 2021, a estimativa de pessoas entre 20-79 anos afetadas pelo DM foi de aproximadamente 536,6 milhões, o que corresponde a 10,5% da população mundial nessa faixa etária. A previsão é que esse número aumente para 783,2 milhões (12,2%) até 2045 (International Diabetes Federation, 2021). No Brasil, a IDF relatou um aumento de 26,61% no número de pacientes diabéticos nos últimos dez anos. Atualmente, o país ocupa a sexta posição no ranking mundial, com 15,7 milhões de pessoas vivendo com diabetes, e a previsão é que esse número alcance 23,2 milhões até 2045 (Sun *et al.*, 2022a).

Segundo dados do Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) a incidência de DM na população ≥ 18 anos nas

capitais brasileiras é de 10,2%, sendo 11,1% entre as mulheres e de 9,1% entre os homens. João Pessoa na Paraíba apresentou incidência de 7,2%, sendo 7,3% entre as mulheres e 7,2% entre os homens (Brasil, 2023). Segundo dados do IBGE em seu último censo, João Pessoa possuía 825.796 mil habitantes (Brasil, 2021), em uma projeção estimada, cerca de 78,276 mil habitantes apresentavam diagnóstico de DM no município.

Esses dados epidemiológicos afetam diretamente os sistemas de saúde de todos os países, gerando um aumento significativo nos custos com tratamento e manejo da doença. Os gastos globais com saúde relacionados ao diabetes foram estimados em 966 bilhões de dólares em 2021, com uma projeção de aumento para 1.054 bilhões de dólares até 2045. Esse crescimento nos custos é impulsionado por fatores como o aumento da prevalência do diabetes, o envelhecimento da população e o maior custo das terapias avançadas. No Brasil, a despesa foi de 42,9 milhões de dólares em 2021, com uma estimativa de que atingirá 51,4 milhões de dólares em 2025. Esses gastos incluem não apenas o tratamento direto do diabetes, mas também o manejo das complicações associadas, como doenças cardiovasculares, nefropatias e retinopatias, que exigem intervenções médicas complexas e onerosas (International Diabetes Federation, 2021).

Além disso, esse distúrbio metabólico causa diversas complicações, sejam elas agudas ou crônicas. As complicações metabólicas agudas do diabetes são: a cetoacidose diabética (CAD), estado hiperglicêmico hiperosmolar (EHH) e hipoglicemia (American Diabetes Association, 2019). Entre as macrovasculares, destacam-se o infarto agudo do miocárdio (IAM), a doença arterial coronariana (DAC), o acidente vascular cerebral (AVC) e a doença vascular periférica. A doença cardiovascular é uma preocupação significativa, aumentando o risco de doenças cardíacas e AVCs. A doença vascular periférica reduz o fluxo sanguíneo para os membros devido ao estreitamento das artérias, elevando o risco de infecções e amputações (Rangel; Rodrigues; De Sá, 2019).

Por sua vez, as complicações crônicas microvasculares são principalmente a neuropatia diabética, causada pela hiperglicemia prolongada, que resulta em danos aos nervos e sintomas como dor, parestesia e perda de sensibilidade, especialmente nos pés e mãos, podendo levar ao desenvolvimento de úlceras e, em casos graves, amputações (Feldman *et al.*, 2019). A nefropatia diabética, decorrente de danos aos rins, que pode levar à insuficiência renal crônica e é uma das principais causas de doença renal em estágio terminal, frequentemente necessitando de diálise ou transplante renal (Samsu, 2021). A RD por sua vez, envolve danos aos vasos sanguíneos da retina, o que pode causar perda de visão e, eventualmente, cegueira, com a forma proliferativa sendo particularmente mais grave devido ao crescimento anormal de vasos na

retina (Wang; Lo, 2018). Essas complicações são decorrentes principalmente do controle glicêmico inadequado (Monami *et al.*, 2021), da duração do diabetes (Arambewela *et al.*, 2018) e da hipertensão (Liu; Ma; Tong, 2020).

Os critérios adotados para o diagnóstico da diabetes, conforme estabelecidos pela *American Diabetes Association*, consideram vários parâmetros. São eles: glicemia de jejum igual ou superior a 126 mg/dL após um período de jejum de pelo menos 8 horas; glicemia após Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) igual ou superior a 200 mg/dL 2 horas após a ingestão de 75 g de glicose; glicemia ao acaso igual ou superior a 200 mg/dL em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia; e níveis de hemoglobina glicada (A1C) igual ou superior a 6,5%. Esses critérios são essenciais para o diagnóstico correto e o início do tratamento adequado (American Diabetes Association, 2024).

Alguns fatores aumentam a chance de desenvolver o DM2 e podem ser classificados como não modificáveis e modificáveis. Entre os fatores de risco não modificáveis estão a idade, histórico familiar de diabetes (Razavi *et al.*, 2020), etnia (com maior prevalência em grupos como afro-americanos, hispânicos, nativos americanos e asiáticos) (Rodríguez; Campbell, 2017) e histórico de diabetes gestacional. Por outro lado, os fatores de risco modificáveis incluem a obesidade, a inatividade física (Bennasar-Veny *et al.*, 2020), hipertensão, dislipidemia (Bjornstad *et al.*, 2021), dieta inadequada rica em açúcares e gorduras saturadas, e o tabagismo (Zheng; Ley; Hu, 2018). Esses fatores são diretamente influenciáveis por mudanças no estilo de vida e intervenções comportamentais, podendo reduzir significativamente o risco de desenvolver DM2 e suas complicações (Uusitupa *et al.*, 2019).

Uma fração significativa dos pacientes com DM2 frequentemente apresenta complicações avançadas que podem ser difíceis de gerenciar e onerosas de tratar. Entre as complicações do DM2, a RD é uma das complicações mais comuns e uma das principais causas de cegueira nessa população (Khalil, 2017). Dados epidemiológicos da *International Diabetic Federation* estimou que a prevalência global da RD em 2019 era superior a 25% (Debele *et al.*, 2021). No Brasil, dados recentes indicam que essa prevalência é ainda maior, atingindo cerca de 36,28% dos pacientes com DM2 (Chagas *et al.*, 2023).

A RD é uma complicação do diabetes caracterizada por alterações na vasculatura da retina, resultando em uma redução do fornecimento de sangue à retina e danos no microambiente retiniano. Essas alterações causam perturbações metabólicas que comprometem tanto a estrutura quanto a função da retina, levando a uma progressiva perda de visão. A hiperglicemia crônica ativa uma série de mecanismos fisiopatológicos que levam às lesões retinianas clássicas da RD. As principais manifestações incluem microaneurismas, hemorragias

intrarretinianas, perolização venosa (alterações de calibre venoso consistindo em áreas alternadas de dilatação e constrição venosa), anormalidades microvasculares intrarretinianas, exsudatos duros (depósitos de lipídios) e neovascularização retiniana (Wong *et al.*, 2018).

De acordo com a *International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale*, a RD pode ser classificada de acordo com o grau de severidade da doença. Essa escala representa uma versão reduzida da classificação da RD do *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS) (Gangnon *et al.*, 2008). Ela descreve três estágios de retinopatia não proliferativa, um quarto estágio de retinopatia não proliferativa severa e um quinto estágio de retinopatia proliferativa.

O primeiro estágio de retinopatia é a não proliferativa leve (não há sinais aparentes de RD); no segundo estágio ocorre a retinopatia diabética não proliferativa leve (RDNP leve), caracterizada pela presença de microaneurismas, apenas; no terceiro estágio ocorre a retinopatia diabética não proliferativa moderada (RDNP moderada), caracterizada pela presença de exsudatos, hemorragias superficiais, hemorragias puntiformes (dot), hemorragias em borrão (blot) e alterações venosas (dilatação e tortuosidade generalizadas, segmentação - *beading* ou *sausage-like* – e formação de alças *looping*). No entanto, não atingem as características que definem a RDNP severa. Manchas algodinosas e hemorragias intrarretinianas profundas também podem estar presentes, indicando isquemia progressiva (Wilkinson *et al.*, 2003).

O quarto estágio é a retinopatia diabética não proliferativa severa (RDNP severa): Nesse estágio ocorre ausência de neovascularização e presença de pelo menos um dos seguintes sinais: Hemorragias intrarretinianas nos 4 quadrantes; Alterações venosas em pelo menos 2 quadrantes; Anormalidades microvasculares intrarretinianas (AMIR) em pelo menos 1 quadrante. O quinto e último estágio é denominado Retinopatia diabética proliferativa (RDP): caracterizada pela presença de neovasos no fundus e/ou hemorragia vítrea ou pré retiniana. Os neovasos podem ser de disco óptico ou NVE (*neovascularization elsewhere*) (Wilkinson *et al.*, 2003).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da RD são a duração do diabetes (Al Ghamdi, 2020), o mal controle glicêmico caracterizado principalmente por níveis elevados de hemoglobina glicada (HbA1c) (Shiferaw *et al.*, 2020), hipertensão arterial (Liu *et al.*, 2020a). Outros fatores de risco para RD incluem obesidade (Zhu *et al.*, 2018), puberdade e gravidez, cirurgia de catarata (Wong *et al.*, 2018). Também são citados etnia (Singh *et al.*, 2021), idade (Tan *et al.*, 2019), sexo (Qian *et al.*, 2022) e níveis elevados de triglicerídeos e Lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Alattas *et al.*, 2022). Especialmente, a Dislipidemia também é um fator

de risco independente para a RD, pois níveis elevados de LDL e triglicerídeos têm sido associados a um maior risco de RD e pior prognóstico. A hipertrigliceridemia e o aumento de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) podem contribuir para a disfunção endotelial, promovendo o acúmulo de lipídios nos vasos sanguíneos retinianos, o que agrava o quadro de RD (Jeong *et al.*, 2024).

Além dos diversos fatores de risco apresentados, estudos recentes têm apontado para a identificação de potenciais biomarcadores moleculares como fatores de risco para as complicações do DM2, sejam eles genéticos (Fan *et al.*, 2020) ou epigenéticos, como a metilação (Cai *et al.*, 2022). Além disso, modificações de histonas (Wang *et al.*, 2024) e microRNAs são considerados potenciais alvos moleculares e biomarcadores epigenéticos da RD (Ma *et al.*, 2022; Martinez; Peplow, 2019; Santovito *et al.*, 2021; Smit-McBride; Morse, 2021).

2.2 EPIGENÉTICA E *MIR-9-3*

A epigenética, é definida como o estudo das alterações da função dos genes que são hereditárias por via mitótica e/ou meiótica e que não implicam uma alteração da sequência do DNA (Wu; Morris, 2001). Essas modificações podem ser globais, afetando todo o genoma, ou específicas de tecido, regulando a expressão gênica de maneira localizada, de acordo com as necessidades funcionais específicas daquele tecido. As marcas globais são cruciais em processos celulares amplos, como envelhecimento, enquanto as marcas específicas desempenham papéis mais especializados, como a regulação de genes envolvidos na diferenciação celular (Jaenisch; Bird, 2003; Inbar-Feigenberg *et al.*, 2013).

Além de afetar esses processos celulares fundamentais, as modificações epigenéticas desempenham um papel crucial no gerenciamento da informação gênica, determinando como os genes são ativados ou silenciados em diferentes contextos biológicos. Dessa forma, padrões epigenéticos são fundamentais tanto no processo de envelhecimento quanto na susceptibilidade a uma ampla gama de doenças, como câncer, obesidade, doenças cardiovasculares e metabólicas, incluindo DM2 e suas complicações (Cordero; Li; Oben, 2015; Mannar *et al.*, 2023).

Entre os mecanismos epigenéticos mais estudados, destacam-se a metilação do DNA, as modificações de histonas e a regulação de genes por microRNAs (*miRs*) não codificantes. Esses mecanismos influenciam diretamente a expressão gênica de forma hereditária, sem alterar a sequência do DNA, sendo muitas vezes reversíveis e até mesmo passíveis de serem

transmitidos entre gerações (Berger *et al.*, 2009).

A metilação de DNA é um mecanismo de regulação da transcrição gênica no qual o grupo metil é ligado ao resíduo de citosina, seguido por uma guanina (dinucleotídeo CpG). Esse processo é considerado um dos principais mecanismos de silenciamento gênico, especialmente em regiões promotoras ricas em ilhas CpG, e está intimamente associado à manutenção da estabilidade genômica (Bird, 1986). As modificações de histonas, como a acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação alteram a estrutura da cromatina. Essas modificações, que ocorrem nas caudas de histonas, determinam se a cromatina está em uma forma mais condensada (heterocromatina), associada ao silenciamento gênico ou em uma forma mais aberta (eucromatina) favorecendo a transcrição (Kouzarides, 2007).

Por fim, os microRNAs (*miRs*) compõem uma classe de pequenos RNAs não codificantes, com aproximadamente 22 nucleotídeos, que regulam a expressão gênica de forma pós-transcricional. Atuando principalmente por meio do silenciamento de RNAs mensageiros (RNAm) alvo, os *miRs* são capazes de reduzir a tradução de proteínas ou promover a degradação do RNAm, exercendo, assim, um controle fino sobre diversos processos celulares. A regulação mediada por *miRs* é crucial para a homeostase celular e está envolvida em diversas condições patológicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (He; Hannon, 2004; Reddy; Zhang; Natarajan, 2015).

Os *miRs* são elementos essenciais na regulação de uma variedade de processos importantes relacionados ao diabetes e suas complicações crônicas (Vasu *et al.*, 2019; Kowluru; Mohammad, 2022). Eles regulam diversos processos celulares envolvidos na patogênese da RD, tais como: diferenciação das células beta do pâncreas (Sabouri *et al.*, 2020), proliferação (Luo *et al.*, 2020; Mziaut *et al.*, 2020; Sun; Chen; Jin, 2020) e apoptose (Xiao *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020). Além disso, estudos têm relacionado o nível de diversos *miRs* com o diagnóstico de DM2 (Al-muhtareh; Al-kafaji, 2018; Jiménez-Lucena *et al.*, 2018; Mastropasqua *et al.*, 2021; Taheri *et al.*, 2023) e também com o diagnóstico de RD (Helal *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2024).

A biossíntese dos *miRs* é um processo complexo que envolve múltiplas etapas, iniciando com a transcrição dos *miRs* pela RNA polimerase II (pol II). A partir dessa transcrição, formam-se os transcritos primários (pri-miRNAs), que possuem uma estrutura característica: uma extremidade cap 5' e uma cauda poli-A na outra. No núcleo, esses pri-miRNAs são processados pela endonuclease RNase III, chamada DROSHA, em conjunto com seu cofator DGCR8, resultando na liberação de precursores de *miRs* (pre-miRNAs) em forma de grampo, com aproximadamente 60-75 nucleotídeos (Huppi *et al.*, 2007; Mack, 2007; Arão *et al.*, 2012).

Uma vez formados, os pre-miRNAs são exportados do núcleo para o citoplasma através do complexo Exportina-5/Ran-GTP. No citoplasma, esses precursores são clivados pela RNase III, denominada DICER, que gera um duplex de miRNA maduro, composto por cerca de 22 nucleotídeos. Nesse estágio, apenas uma das fitas do duplex é incorporada ao complexo multiproteico de indução de silenciamento de RNA (RISC). Esse complexo desempenha um papel crucial na regulação negativa da expressão de RNA mensageiro, modulando processos celulares essenciais (Arão *et al.*, 2012; Fuziwara; Kimura, 2014). Essa sequência de eventos ilustra a sofisticação do processo de síntese dos microRNAs, que está envolvido em mecanismos regulatórios pós-transcricionais fundamentais para diversas funções celulares. A figura 1, a seguir, apresenta o mecanismo detalhado da síntese de microRNA.

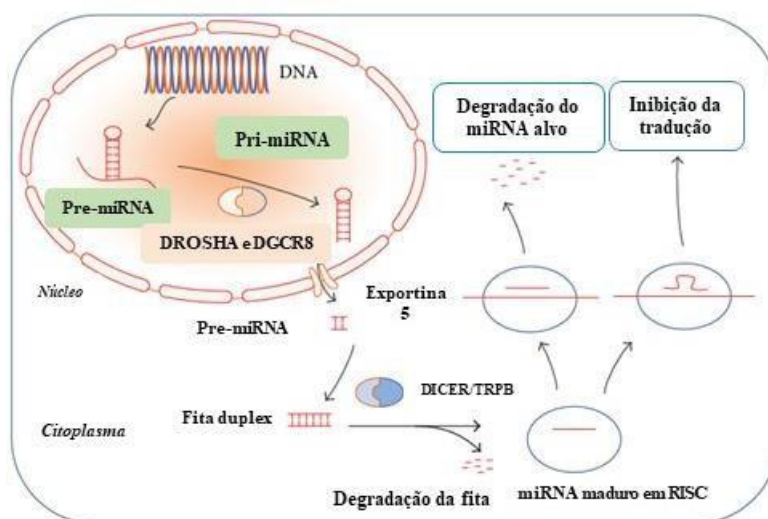


Figura 1: Síntese de microRNA. Fonte: Dados da pesquisa, adaptado de Wu *et al.*, (2014).

A síntese dos miRNAs inicia no núcleo com a clivagem do pri-miRNA por Ribonuclease III do tipo Drosha (DROSH)/Gênero Crítico da Síndrome DiGeorge 8 (DGCR8), gerando o pre-miRNA. Este é exportado para o citoplasma via exportina-5, onde é processado pela Ribonuclease III Dicer (DICER)/Proteína de ligação ao RNA TAR (TRBP), formando uma fita dupla. Após a separação, o miRNA maduro é incorporado ao complexo RISC, onde regula a expressão gênica ao promover a degradação do mRNA alvo ou inibir sua tradução.

O efeito final da atividade dos *miRs* é a inibição da síntese das proteínas codificadas pelos RNAm alvo, um mecanismo que ocorre principalmente através da interação entre os *miRs* e a região 3' não traduzida (3' UTR) dos RNAm. Essa interação pode resultar em dois efeitos principais: a degradação do RNAm ou a inibição da tradução da proteína. Como resultado, há uma diminuição na quantidade de proteína produzida, o que leva a uma regulação negativa da expressão gênica. Esse processo pós-transcricional é fundamental para o controle da homeostase celular, visto que permite um ajuste fino na quantidade de proteínas produzidas,

dependendo das necessidades específicas da célula em resposta a sinais externos ou alterações no microambiente celular (Platania *et al.*, 2019).

Além de seu papel na regulação da síntese proteica, os *miRs* também podem influenciar outros processos celulares ao regular diversos genes de maneira simultânea, formando uma rede complexa de regulação gênica (Saliminejad *et al.*, 2019). Alguns *miRs* são considerados oncomirs, que têm papéis críticos na promoção ou supressão do desenvolvimento de câncer (Tucci, 2022), enquanto outros estão envolvidos na regulação de processos metabólicos, inflamatórios e imunológicos. A regulação inadequada ou desregulação desses *miRs* está diretamente associada a várias patologias, como, obesidade, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (Li *et al.*, 2021; Kramna; Riedlova; Jirik, 2023; Tucci, 2022; Li *et al.*, 2023).

Além dessas doenças, o DM2 é um exemplo particularmente relevante em que a desregulação dos *miRs* desempenha um papel crucial na sua fisiopatologia (Du *et al.*, 2021). A desregulação dos *miRs* também está associada a condições, resistência à insulina e síndrome metabólica (Li *et al.*, 2021). Fatores externos como hiperglicemia, estresse oxidativo e inflamação podem alterar o perfil de *miRs* circulantes, refletindo um desequilíbrio na regulação epigenética. Esses mecanismos contribuem significativamente para o desenvolvimento do DM2 e suas complicações microvasculares, incluindo a RD (Vasu *et al.*, 2019; Wang; Li, 2020; Kaur, 2022).

Nesse contexto, evidências apontam padrões de expressão de miRNAs capazes de diferenciar entre diabéticos com RD, diabéticos sem RD e indivíduos sem diagnóstico de diabetes (Angelescu *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022). Essa nova classe de biomarcadores tem se tornado um alvo terapêutico promissor para a RD, demonstrando a relevância de biomarcadores moleculares. Portanto, esta é uma área de exploração em expansão no contexto do DM2 e suas complicações, incluindo RD. Apesar de existirem centenas de miRNAs relacionados ao DM2, nem todos têm implicações na RD. Revisões recentes destacam os principais *miRs* que têm relação com a patogênese da RD (Chang *et al.*, 2021; Chi *et al.*, 2021; Kordkheyli *et al.*, 2021; Rezazadeh-Gavvani, *et al.*, 2023; Zhong, *et al.*, 2024). A síntese de alguns estudos encontra-se na tabela 1.

Chen, Zhu e Zhao (2020) demonstraram que a expressão de miR-10b reduziu distintamente os níveis de expressão do fator de troca de nucleotídeos Rho guanina (TIAM1) e da NADPH-oxidase 2 (NOX2) em células endoteliais da retina humana (CERH) estimuladas com glicose. Ye e Steinle (2015) observaram que a expressão de miR-15b e miR-16 é reduzida em CERH cultivadas sob condições hiperglicêmicas por três dias. Além disso, constataram que

a superexpressão de miR-15b e miR-16 inibe os níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e do supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3), enquanto aumenta a proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 3 (IGFBP-3) e a fosforilação do receptor de insulina (IR). Esses achados sugerem que miR-15b e miR-16 desempenham um papel na inibição da resistência à insulina, resultando na proteção das CERH contra a apoptose induzida por hiperglicemia.

O efeito regulador do miR-20b na mediação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pela proteína quinase B3 (AKT3) foi confirmado in vivo em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Isso indica que o miR-20b tem como alvo direto a AKT3 e modula as alterações mediadas pelo VEGF na RD (Qin *et al.*, 2016). A superexpressão de miR-20b-5p também tem como alvo a trombospondina 1 (THBS1) via a cascata VEGF/fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K)/AKT, participando da apoptose celular em células endoteliais de ratos (Ma *et al.*, 2021).

A inibição de miR-21-5p pode efetivamente reduzir a proliferação e a angiogênese em CERH, efeitos que podem ser mediados pela supressão das vias PI3K/AKT e proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) via regulação da maspina (Qiu *et al.*, 2018). Tang *et al.* (2020) descobriram que o miR-29b-3p pode regular negativamente a sirtuina 1 (SIRT1), diminuindo assim a apoptose em CERH. O miR-30a ativa a microglia da retina de maneira dependente do receptor NLRP3, promovendo a progressão da RD (Dong; Wang, 2019). Além disso, o miR-34a pode promover a disfunção mitocondrial e a senescência das células endoteliais microvasculares da retina, inibindo o eixo SIRT1/coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PGC-1 α) e os antioxidantes mitocondriais TrxR2 e SOD2 (Thounaojam *et al.*, 2019).

Outros estudos mostraram que o miR-139-5p inibe a via VEGF/fator de crescimento derivado de plaquetas B (PDGF-B), o que reduz a migração de CERH, a formação de tubos e a proliferação celular, levando a uma diminuição na sobrevivência de células disfuncionais (Luo *et al.*, 2021). Já o miR-146a desempenha um papel regulador na via inflamatória mediada pelo fator nuclear kappa B (NF- κ B), com sua elevada expressão na retina reduzindo a atividade de genes-alvo cruciais como CARD10, IRAK1 e TRAF6, consequentemente modulando a resposta inflamatória (Zhuang; Muraleedharan; Xu, 2017). Finalmente, o miR-148a-3p atua na mitigação da RD induzida por glicose elevada ao direcionar o fator de crescimento transformador beta 2 (TGFB2) e o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF2). Sua superexpressão resulta em aumento da viabilidade celular e diminuição de apoptose das células retinianas (Wang *et al.*, 2020).

Estudos mostram que pacientes com RD apresentam alta expressão de miR-195 e baixa expressão de SIRT1. A inibição de miR-195 foi associada ao aumento da proliferação celular e à redução de apoptose em CERH, sugerindo um efeito protetor. Além disso, o miR-195 tem como alvo a SIRT1, inibindo seu efeito protetor contra a apoptose. Esses achados indicam que o miR-195 pode atuar como um fator patogênico na RD, e sua inibição pode representar uma nova abordagem terapêutica para o tratamento dessa condição (Shan *et al.*, 2022). A neutralização de miR-195 resgata diretamente a expressão de SIRT1 e reduz o dano tecidual na RD, destacando o papel potencial da sinalização mediada por miR-195 via SIRT1 na modulação da função das células endoteliais da retina (Mortuza; Feng; Chakrabarti, 2014).

Por outro lado, a regulação positiva de miR-199a-3p melhora a angiogênese estimulada por glicose elevada em CERH ao modular a via PI3K/AKT por meio da inibição do VEGF (Wang; Liu; Huang, 2020). O estudo de Liu *et al.* (2020) mostrou que a expressão de miR-216a promoveu a viabilidade de CERH sob tratamento com d-glicose e inibiu a expressão de óxido nítrico sintase 2 (NOS2) e a ativação da via de sinalização janus quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição (JAK/STAT). Por fim, o miR-455-5p demonstrou envolvimento na patogênese da RD. A expressão diminuída de miR-455-5p interfere na ativação do transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) em células imunes circulantes, contribuindo para a degeneração microvascular da retina e possivelmente desempenhando um papel na iniciação da RD em DM1 (Chen *et al.*, 2019).

Tabela 1 - Principais miRNAs envolvidos na patogênese da Retinopatia Diabética.

Nome do miRNA	Expressão do miRNA	Modelo [	Alvo	Função na RD	Referência
miR-10b	<i>upregulation</i>	Células endoteliais da retina humana	TIAM1 e NOX2	↓ expressão de TIAM1 e NOX2	Chen; Zhu; Zhao, (2020)
miR-15/16	<i>upregulation</i>	Células endoteliais da retina humana	TNF- α , SOCS3, IGF-3 e RI	↓ TNF- α e SOCS3, ↑ IGF-3 e RI	Ye; Steinle, (2015)
miR-20b	<i>upregulation</i>	Células endoteliais da retina de ratos	VEGF	↓ Expressão de VEGF mediado pelo silenciamento de AKT3	Quin <i>et al.</i> (2016)
	<i>upregulation</i>	Tecidos da retina de ratos	THBS1	↑ THBS1 via inibição da cascata de sinalização VEGF/AKT/PI3K	Ma <i>et al.</i> (2021)
	<i>dowregulation</i>	Células endoteliais da retina humana	Maspin	Supressão das vias PI3K/AKT e ERK via regulação da maspina	Qiu <i>et al.</i> (2018)
miR-29b-3p	<i>upregulation</i>	Células endoteliais da retina	VEGFA e PDGFB	↓ Expressão de VEGFA e PDGFB via ciclinas A2, D1 e E1	Tang <i>et al.</i> (2020)
	<i>upregulation</i>	Células endoteliais da retina de ratos	SIRT1	↓ Expressão de SIRT1 que promove apoptose em CERH	Zhang <i>et al.</i> (2021)
miR-30a	<i>dowregulation</i>	Células endoteliais microvasculares da retina rato	NLRP3	↓ NLRP3 em células da micróglia	Dong, Wang <i>et al.</i> (2017)
miR-34	<i>upregulation</i>	Células endoteliais microvasculares da retina humana	SIRT1/PGC-1 α	Inibe eixo SIRT1/PGC-1 α mediado pelo antioxidante mitocondrial TrxR2	Menaka <i>et al.</i> (2019)

miR-139-5p	<i>upregulation</i>	Células endoteliais da retina humana	VEGF/PDGF-B	↓ expressão de VEGF/PDGF-B, formação de tubo e proliferação das células endoteliais	Luo <i>et al.</i> , (2021)
miR-146	<i>upregulation</i>	Células endoteliais da retina de ratos	NF-κB	↓ NF-κB via genes CARD10, IRAK1 e TRAF	Zhuang; Muraleedharan; Xu, (2017)
miR-148a	<i>upregulation</i>	Células endoteliais da retina humana	TGFB2 e FGF2	↑ TGFB2 e FGF2 atenua a angiogênese	Wang <i>et al.</i> , (2020)
miR-195	<i>upregulation</i>	Células endoteliais da retina humana	SIRT1	↑ SIRT1 diminuindo dano tecidual	Shan <i>et al.</i> (2021)
miR-199a	<i>upregulation</i>	Retina de ratos diabéticos	PI3K/AKT/VEGF	↓ da via de sinalização PI3K/AKT/VEGF estimulada por glicose alta e a angiogênese	Wang; Liu; Huang, (2020).
miR-200b	<i>upregulation</i>	VEGF e TGF-β1	↓ VEGF e TGF-β1	↓ CERH de humanos com RD	Jiang <i>et al.</i> (2015)
	<i>dowregulation</i>	VEGF e YAP1	↑ VEGF e ↑ YAP1	↑ CERH via regulação positiva de MALAT1	Han <i>et al.</i> (2020)
miR-216a	<i>upregulation</i>	Retinas de ratos, Células endoteliais da retina humana	NOS2/JAK/STAT	↑ viabilidade de CEMR e suprime o eixo NOS2/JAK/STAT.	Liu <i>et al.</i> (2020b)
miR-455-5p	<i>dowregulation</i>	Células endoteliais microvasculares da retina humana	STAT3	↑ STAT3 contribui para degeneração da retina	Chen <i>et al.</i> , (2019)

Legenda: AKT: Proteína Kinase B; CARD10: domínio de recrutamento de caspase; FGF2: Fator de crescimento fibroblástico básico; IGF-3: Fator de crescimento semelhante à insulina 3; CERHs: células endoteliais da retina de humanos; IRAK: quinase 1 associada ao receptor de interleucina 1; JAK: Janus quinase; MALAT1: Transcrição 1 de adenocarcinoma pulmonar associado à metástase; NF-Kb: Fator Nuclear Kappa beta; NLRP3: domínio pirina da família NLR contendo 3; NOS2: Óxido Nítrico Sintase 2; NOX2: NADPH-oxidase 2; PDGFB: fator de crescimento derivado de plaquetas B; PI3K: Fosfoinositídeo 3-quinase; PGC-1α: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa; SIRT1: Sirtuina; SOCS3: supressor da sinalização de citocinas 3; STAT3: transdutor de sinal e ativador da transcrição 3; TIAM1: Fator de troca de nucleotídeos Rho guanina; TGFβ1: fator de crescimento transformador beta 1; TGFβ2: fator de crescimento transformador beta 2; THBS1: trombospondina 1; TNF-α: Fator

de Necrose tumoral alfa; TrxR2: tioredoxina redutase 2; TRAF: O fator 1 associado ao receptor de TNF; VEGF: Fator de Crescimento do endotélio Vascular; 1; YAP1: Regulador de transcrição associado yes1.

O *miR-9* é uma classe de microRNAs que possui três loci distintos no genoma humano, cada um localizado em diferentes cromossomos: *miR-9-1* no cromossomo 1, *miR-9-2* no cromossomo 5 e *miR-9-3* no cromossomo 15 (Ralla *et al.*, 2018). Esses loci geram variantes do *miR-9* que, apesar de terem sequências semelhantes, podem ter diferentes funções regulatórias em diversos contextos biológicos e tipos celulares. A expressão desses microRNAs é regulada por mecanismos epigenéticos, sendo a metilação do DNA um dos principais. No caso do *miR-9*, a hipermetilação das regiões promotoras associadas aos loci *miR-9-1*, *miR-9-2* e *miR-9-3* pode bloquear a transcrição dos seus precursores, conhecidos como *primiRs*, resultando em uma redução na produção de *miR-9* maduro (Hildebrandt *et al.*, 2010).

O *miR-9* desempenha funções críticas na regulação de processos celulares e está envolvido em várias doenças crônicas devido ao seu papel na diferenciação neuronal, resposta imunológica e angiogênese. Ele está particularmente associado a doenças neurodegenerativas como a doença de Huntington, Alzheimer e Parkinson (Wu *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2021; Peplow; Martinez, 2021). No caso da doença de Alzheimer, evidências sugerem que o *miR-9* participa da modulação da produção de proteínas associadas à formação de placas amiloides, influenciando assim a progressão da demência (Walgrave *et al.*, 2021). Além disso, no Parkinson, o *miR-9* tem um papel na regulação da neuroinflamação e da sobrevivência neuronal, fatores críticos para a manutenção da função motora e a proteção contra a degeneração dos neurônios dopaminérgicos (Tang; Sun, 2020). Esses estudos destacam como o *miR-9* pode atuar como um regulador-chave em diferentes vias patológicas, oferecendo potenciais alvos para intervenções terapêuticas em diversas doenças crônicas.

O *miR-9* tem ganhado destaque como um biomarcador e alvo terapêutico promissor, especialmente no câncer, onde seu estudo é mais proeminente (Chakraborty *et al.*, 2023). A expressão desregulada do *miR-9* em tumores está fortemente associada à progressão tumoral, invasão celular e resistência a tratamentos, tornando-o um foco prioritário para intervenções terapêuticas (Liu *et al.*, 2021; Tapeh *et al.* 2021; Szczepanek; Skorupa; Tretyn, 2022). Pesquisas pré-clínicas demonstram que a inibição do *miR-9*, por meio de antagomirs, pode reduzir a proliferação celular e aumentar a sensibilidade das células tumorais à quimioterapia, destacando seu potencial como estratégia terapêutica no câncer (Kim; Croce, 2023). Assim, o câncer se destaca como o campo em que o conhecimento sobre o *miR-9* tem impulsionado novas abordagens terapêuticas e fornecido suporte para expandir seu estudo em outras doenças crônicas.

Nesse sentido, no contexto do DM2, o *miR-9* é comumente reconhecido por sua expressão nas células β pancreáticas, responsáveis pela secreção de insulina, e sua elevação tem sido associada a efeitos relevantes da doença. Estudos demonstraram que o aumento na expressão de *miR-9* está relacionado a alterações na secreção de insulina estimulada por glicose em modelos *in vitro* e *in vivo*. O *miR-9* modula a expressão de granulofilina, uma proteína que desempenha um papel crucial na secreção de insulina. A granulofilina é regulada pelo fator de transcrição ONECUT2 (OC2), ela atua como efetor das proteínas Rab3 e Rab27, e está associada aos grânulos secretores de células β pancreáticas e de outras células endócrinas. Ela desempenha um papel importante na modulação da exocitose de insulina (Coppola *et al.*, 2002). De fato, quando essa proteína é superexpressa em células β , ocorre uma redução significativa na liberação de insulina em resposta a estímulos secretagogos (Plaisance *et al.*, 2006; Fukuda, 2006).

O *miR-9* é identificado como um componente chave na regulação da expressão da proteína Sirt1, uma desacetilase nuclear, em células β pancreáticas. A expressão de Sirt1 é alterada durante a secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS). Em experimentos utilizando células b-TC-6 sob condições que imitam a fase de declínio da secreção de insulina, foi demonstrado que o *miR-9* regula negativamente os níveis de Sirt1. O aumento da expressão de *miR-9* resulta na redução dos níveis de proteína Sirt1, comprometendo a secreção de insulina dependente de glicose. Esse processo ocorre porque o *miR-9* tem como alvo o 3'UTR do mRNA de Sirt1, levando a uma regulação negativa de seus níveis proteicos (Ramachandran *et al.*, 2011).

Sirt1 com a expressão reduzida, por sua vez, aumenta a expressão do gene que codifica a proteína desacopladora mitocondrial UCP2, que desempenha um papel importante no aumento da secreção de insulina estimulada por glicose (Bordone *et al.*, 2006; Moynihan *et al.*, 2005). O aumento na expressão de UCP2 pode levar a uma redução na eficiência da produção de ATP, o que diminui a quantidade disponível para fechar os canais de K^+ controlados por ATP. Essa condição pode dificultar ainda mais a despolarização da membrana celular e a subsequente liberação de insulina. Como resultado, a secreção de insulina se torna prejudicada, o que impacta negativamente a regulação dos níveis de glicose no sangue.

As moléculas citadas estão envolvidas indiretamente na secreção de insulina mediada pela elevação dos níveis de glicose ou pela exposição das células secretoras à glicose. A figura 2 mostra um modelo de regulação da secreção de insulina mediado por *miR-9* nas células β pancreáticas.

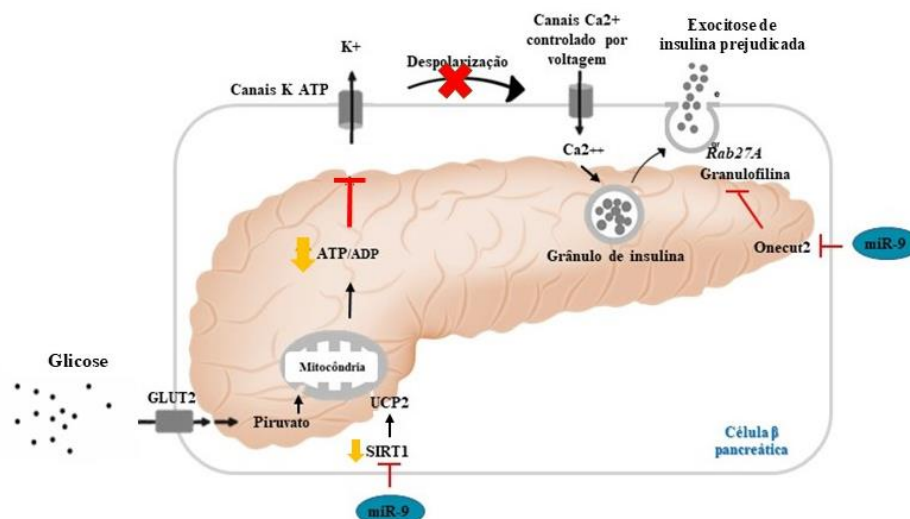


Figura 2: regulação da secreção de insulina mediada por miR-9

A entrada de glicose pelo Transportador de Glicose 2 (GLUT2) nas células β pancreáticas leva à produção de Adenosina Trifosfato (ATP). A expressão elevada de miR-9 reduz SIRT1, aumentando a UCP2 e diminuindo a eficiência na produção de ATP. Com menos ATP, os canais de K^+ controlados por ATP não se fecham adequadamente, prejudicando a despolarização da membrana e a abertura dos canais de Ca^{2+} . Isso compromete a exocitose de insulina. MiR-9 também inibe Fator de Transcrição Cut-Homeobox 2 (Onecut2), Membro da Família RAS Oncogene 27A (Rab27A) e granulofilina, sendo que a inibição da granulofilina prejudica a migração dos grânulos de insulina para a membrana celular, afetando ainda mais a secreção de insulina e a regulação glicêmica.

Um possível mecanismo que pode explicar a relação entre miR-9 e a retinopatia diabética (RD) envolve o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF). O VEGF é uma proteína crucial na regulação da angiogênese, induzindo a proliferação, migração e permeabilidade das células endoteliais (Ferrara, 2005). Inicialmente identificado como uma proteína secretada por tumores, o VEGF é principalmente estimulado pela hipóxia, o que leva ao aumento de sua secreção e subsequente angiogênese nos tecidos afetados (Liu *et al.*, 1995).

O VEGF desempenha um papel significativo na fisiopatologia da RD. Níveis elevados dessa proteína no soro têm sido associados à progressão dessa microcomplicação, sendo considerado um biomarcador potencial para o monitoramento da doença (Abu-Yaghi *et al.*, 2020). As terapias anti-VEGF emergiram como tratamentos eficazes para a retinopatia diabética proliferativa, reduzindo o edema macular e melhorando a acuidade visual (Martinez-Zapata *et al.*, 2014). No entanto, esse tratamento é considerado invasivo e pode afetar negativamente a qualidade de vida dos pacientes (Xu *et al.*, 2024).

Nesse contexto, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que o miR-9 desempenha um papel crucial na inibição da neovascularização retiniana na RD ao regular o VEGF. Em um modelo celular de câncer de mama, a compressão mecânica induziu a superexpressão de VEGF-

A por meio de um mecanismo dependente da DNA metiltransferase 3 alfa (DNMT3A), que regula negativamente o miR-9. Esse processo envolve a metilação do promotor do miR-9, levando à redução de seus níveis, o que normalmente suprimiria genes-alvo associados à progressão tumoral, como: Cadeia Gama 2 da Laminina (LAMC2), Integrina Alfa-6 (ITGA6) e Fator de Iniciação de Tradução Eucariótico 4E (EIF4E). A diminuição do miR-9 promove a superexpressão desses genes, resultando na ativação da transcrição de VEGF-A, estimulando a angiogênese e o crescimento tumoral (Kim *et al.*, 2017).

Esse mecanismo também foi testado em um modelo animal de RD, onde a expressão de VEGF-A foi maior na retina de camundongos com a doença. Verificou-se que a expressão de miR-9 estava reduzida, enquanto a de VEGF-A era aumentada, indicando uma relação direta entre miR-9 e VEGF-A, o que promove a neovascularização e contribui para a perda de visão (Liu *et al.*, 2019). Isso sugere um controle epigenético envolvendo a regulação de miR-9 na RD.

Em humanos, o VEGF é um elemento chave na patogênese das microcomplicações do diabetes mellitus tipo 2 (DM2), com níveis elevados de VEGF associados à progressão da nefropatia diabética (Xiao *et al.*, 2019). Além disso, níveis elevados de VEGF foram observados tanto no vítreo quanto no plasma de pacientes com RD em estágios mais avançados (Kim *et al.*, 2017), confirmando sua associação com casos graves da doença (Wang *et al.*, 2014). A superexpressão de VEGF está envolvida em processos críticos, como a formação de microaneurismas, o aumento da permeabilidade da barreira hematorretiniana (BRB) e a estimulação da angiogênese nos estágios avançados da RD (Simo *et al.*, 2006).

Com essas evidências, a relação entre miR-9 e VEGF surge como um alvo terapêutico promissor para intervenções futuras no manejo da RD, destacando a importância do controle epigenético e das terapias antiangiogênicas na abordagem dessa complicação ocular do DM2.

A figura a seguir resume o possível mecanismo relatado nos estudos anteriores.

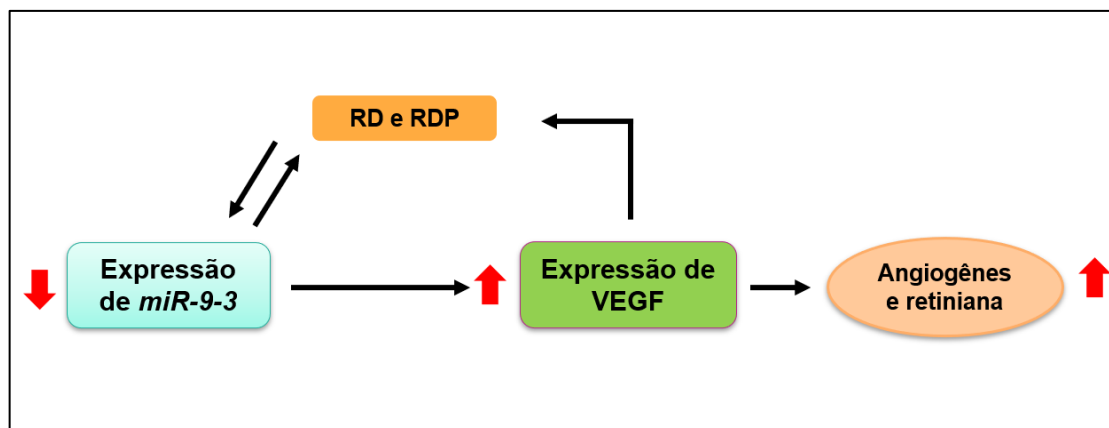


Figura 3: Mecanismo proposto sobre a relação entre *miR-9-3* e VEGF.

Legenda: O aumento da metilação do *miR-9-3* (indicado pela seta vermelha para cima) resulta em uma diminuição da expressão desse microRNA (seta vermelha para baixo). Essa redução é mediada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), que promovem a metilação do DNA, regulando negativamente o *miR-9-3*. Como consequência, a menor expressão do *miR-9-3* leva a um aumento da expressão de VEGF (seta vermelha para cima), que é um fator essencial para a angiogênese retiniana (formação de novos vasos sanguíneos na retina). A superexpressão de VEGF está fortemente associada ao desenvolvimento e progressão da RD e RDP, contribuindo para a disfunção vascular e aumento da permeabilidade na retina.

Além da relação entre o *miR-9* e o VEGF na RD, dados de quantificação em humanos demonstraram que a expressão de *miR-9* foi maior em pacientes recém diagnosticados com DM2 comparados a pacientes sem DM2 (Kong *et al.*, 2011). Quando analisados pacientes com diagnóstico de DM2 há aproximadamente 15 anos, os resultados seguiram a mesma tendência, indicando também níveis mais elevados de *miR-9* em pacientes com DM2 em comparação com controles sem diabetes e pré-diabéticos (Al-Muhtareh; Al-Kafaji, 2018). A literatura mostra que níveis elevados no plasma de *miR-9* foram identificados em pacientes apenas diabéticos e diabéticos com doença arterial coronariana (DAC) em comparação com pacientes com DAC sem diabetes (Motawae *et al.*, 2015). Alguns outros estudos mostraram que níveis elevados de *miR-9* em pacientes com DM2 especialmente à medida que a doença progride, pode ser explicado por um possível envolvimento na inibição da secreção da insulina (Al-Muhtareh; Al-kafaji, 2018; Jiménez-Lucena, 2018).

Um estudo recente demonstrou que a expressão plasmática do *miR-9* está significativamente associada ao diagnóstico de DM2 em pacientes nepaleses recém-diagnosticados, quando comparados a indivíduos normoglicêmicos (Pokharel *et al.*, 2024). Os resultados sugerem que o *miR-9* pode atuar como um biomarcador relevante no diagnóstico precoce do DM2, destacando sua potencial aplicação clínica. Além disso, a pesquisa reforça a importância de investigações adicionais sobre o papel do *miR-9* em diferentes populações, considerando fatores étnicos e genéticos que podem influenciar a expressão desse microRNA.

Nesse sentido, estudos conduzidos com a indivíduos da cidade de João Pessoa

analisaram a relação de alguns *miRs* e complicações da diabetes, especialmente, a potencial relação entre o perfil de metilação de *miR-9-3* e RD (Dos Santos Nunes *et al.*, 2018; De Assis *et al.*, 2021). Dos Santos Nunes *et al.* (2018) compararam a relação do perfil de metilação de promotores dos genes *miR-9-3*, *miR-34a* e *miR-137* em pacientes com RD ou sem RD. Os dados mostraram que a metilação em promotores de diferentes *miRs* pode atuar de forma diferente em complicações diabéticas. Os resultados obtidos no referido estudo fornecem evidências de que o *miR-9-3* metilado aumentou as chances do paciente com DM2 desenvolver RD em aproximadamente 7 vezes. Em contraste, *miR-137* metilado parece atuar como um protetor contra microcomplicações diabéticas (retinopatia e nefropatia). Entretanto, os dados para o *miR-34a* foram inconclusivos para essa relação entre metilação e microcomplicações do DM2.

O estudo transversal realizado por De Assis *et al.* (2021) analisou a relação entre o perfil de metilação do *miR-9-1* e dos *miRs-9-1/9-3* e a RD. Os resultados indicaram que a metilação do *miR-9-1* esteve relacionada à RD, aumentando as chances de desenvolvimento da doença em até 5 vezes. Quando analisada a metilação conjunta de *miR-9-1/9-3*, o risco foi ainda maior, com chances de RD aumentando em até 8 vezes. Outro ponto importante identificado foi que um estilo de vida sedentário atuou como preditor de risco, elevando as chances de desenvolver RD em aproximadamente 6 vezes. Além disso, o estudo mostrou que pacientes com níveis mais baixos de creatinina e proteína C reativa (PCR) apresentaram uma redução significativa na incidência de RD, sugerindo que esses marcadores bioquímicos podem influenciar a progressão da doença.

Os dados apresentados fornecem um conjunto substancial de evidências que elucidam a relação entre a classe de *miR-9* e as complicações associadas ao DM2, especialmente no que se refere à RD. Embora existam estudos que investigam a correlação entre o *miR-9* e o DM2/RD, a literatura ainda carece de dados robustos sobre o papel específico do *miR-9-3* nos diferentes estágios clínicos da RD.

Essa lacuna de conhecimento ressalta a necessidade de estudos mais aprofundados, uma vez que o *miR-9-3* tem o potencial de consolidar-se como um biomarcador precoce para a RD. Tal descoberta poderia proporcionar avanços significativos na prática clínica, impactando diretamente a qualidade de vida dos pacientes ao possibilitar intervenções mais precoces e eficazes, além de reduzir os custos associados ao tratamento a longo prazo. Portanto, a investigação detalhada do *miR-9-3* em diferentes fases da RD é de suma importância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes e personalizadas.

2.3 ATIVIDADE FÍSICA, RETINOPATIA DIABÉTICA E EPIGENÉTICA

Nos últimos anos, estudos na área da epidemiologia da atividade física revelaram que existe uma clara associação negativa entre o nível de atividade física e o aparecimento de diversas doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares e também DM (Sun *et al.*, 2022b; Mu *et al.*, 2022; Kufe *et al.*, 2022). Da mesma forma, a literatura mostra que a atividade física é um importante fator de proteção para DM2 (Hou *et al.*, 2023). Há um benefício direto da atividade física na função das células β pancreáticas (Curran *et al.*, 2020). Esses efeitos positivos impactam diretamente na redução do risco de mortalidade da população diabética (Blond *et al.*, 2020) e também na diminuição dos custos financeiros com saúde (Su *et al.*, 2020).

Atualmente, a *American Diabetes Association* (2019) recomenda que adultos com diabetes pratiquem 150 minutos ou mais de atividade aeróbica de intensidade moderada a vigorosa semanalmente, distribuídos em pelo menos 3 dias por semana, com no máximo dois dias consecutivos sem atividade. Também são recomendadas atividades de intensidade vigorosa com duração mais curta (mínimo de 75 minutos por semana) ou treinamento intervalado com o objetivo de melhorar o condicionamento físico. Estudos forneceram evidências dos benefícios da atividade física na redução do risco de desenvolver RD e constataram que pacientes diabéticos fisicamente menos ativos apresentaram aumento do fluxo sanguíneo na retina, o que contribui para a patogênese da microcomplicação (Hayashi; Ikemura, 2011; Zhang *et al.*, 2012).

Intervenções de estilo de vida como a prática de atividade física podem ser particularmente importantes como tratamento para evitar e/ou minimizar os efeitos da RD, pois pelo fato dessa doença resultar na degeneração das células da retina e subsequente perda de visão ou cegueira em pacientes diabéticos esses pacientes necessitam de tratamentos invasivos (Khaban *et al.*, 2017). Apesar de eficazes, os tratamentos atuais como a fotocoagulação retiniana e injeções intravítreas de anti-VEGF são de alto custo além de serem técnicas invasivas (Gunay; Sekeroglu; Celik, 2015; Gupta *et al.*, 2022). Por esse motivo, é necessário um tratamento mais conveniente e econômico.

Ren *et al.* (2019) em metanálise, descobriram que em pacientes diabéticos, a atividade física tinha uma associação protetora contra RD e constaram que essa influência é mais forte quando o estágio da RD é mais grave. Os autores mostraram que o risco de progressão da RD pode ser reduzido em 40% quando a atividade física não é inferior a 30 minutos praticada por cinco dias por semana (Dirani; Crowston; Wijngaarden, 2014). Esse efeito positivo auxilia atrasando o início e progressão da RD (Alqabandi *et al.*, 2022). Assim como também, há correlação negativa entre nível de atividade física e gravidade da RD (Praidou *et al.*, 2017).

Nesse estudo a coorte incluída foi de 240 pacientes com DM2, com algum estágio da RD comparados com 80 pacientes não diabéticos que serviram como grupo controle.

Apesar da clara relação entre nível de atividade física e RD, estudos que indicam essa relação com fatores epigenéticos são menos frequentes comparado a gama de estudos sobre RD e atividade física. Como sabemos, a metilação do DNA é uma condição epigenética bastante estudada no contexto das doenças crônicas não transmissíveis (Sharp; Relton, 2017) particularmente no DM (Ahmed *et al.*, 2020) que também é evidenciada na RD (Kowluru; Santos; Mishra, 2013) que faz parte da fisiopatologia dessas doenças. Desse modo, evidencia-se a importância de abordar o efeito modulador da atividade física sobre aspectos epigenéticos em pacientes com DM2 e suas complicações.

Rowlands *et al.* (2014) demonstraram que o exercício físico induz alterações epigenéticas significativas, promovendo a remodelação muscular e melhorando o metabolismo energético. Estes resultados sugerem a existência de potenciais alvos terapêuticos para o controle glicêmico e a redução de complicações metabólicas associadas ao DM2. No referido estudo conduzido com polinésios obesos de meia-idade diagnosticados com DM2, os autores observaram que a implementação de um programa de treinamento de resistência, realizado de forma consistente durante um período de 16 semanas, resultou em alterações epigenéticas. Especificamente, houve hipometilação do promotor do gene GLUT-4, que é crucial para a regulação da captação de glicose nas células musculares, e modulação da expressão do *miR-29a*, um microRNA que desempenha um papel importante na regulação do metabolismo e na adaptação muscular ao exercício.

Párrizas *et al.* (2015) realizaram um estudo de coorte com 92 indivíduos, divididos em quatro grupos: 29 controles, 22 pré-diabéticos com glicemia de jejum alterada, 21 pré-diabéticos com tolerância à glicose alterada e 20 pacientes recém-diagnosticados com DM2. Os resultados mostraram que o *miR-192* e *miR-193b* estavam significativamente aumentados nos indivíduos pré-diabéticos, mas não naqueles pacientes com DM2, e que esses níveis retornaram ao normal após uma intervenção com exercício físico crônico. Esses achados foram validados em uma segunda coorte de indivíduos e em um modelo de camundongos com intolerância à glicose, sugerindo que os microRNAs circulantes *miR-192* e *miR-193b* podem ser usados como ferramentas diagnósticas para pré-diabetes e para monitorar a resposta a intervenções terapêuticas, como o exercício físico.

Oliosio *et al.* (2019) investigaram os efeitos do treinamento aeróbico (AER) e de resistência (RES) no perfil de micro-RNAs circulantes em 24 indivíduos com DM2, os quais foram randomizados em dois grupos de 12 participantes cada. O estudo focou nas alterações no

perfil de miRNAs após a realização dos dois tipos de treinamento. Os resultados mostraram que os níveis de miR-423-3p, miR-451a e miR-766-3p foram significativamente aumentados após o treinamento, independentemente do tipo de exercício. Além disso, o miR-451a e o miR-423-3p apresentaram uma correlação positiva com a perda de gordura corporal, sendo identificados como preditores independentes dessa perda. Esses achados ressaltam a influência positiva do exercício físico na regulação dos miRNAs e na gestão da composição corporal em indivíduos com DM2.

Fachim *et al.* (2020) investigou 20 indivíduos com intolerância à glicose (IGR), sendo 10 homens e 10 mulheres, com idade média de 61 anos. A intervenção de 6 meses foi conduzida por telefone e incluiu orientações sobre exercícios e nutrição. Após a intervenção, observou-se um aumento significativo nos níveis dos microRNAs Let-7a e miR-92a, que já haviam sido previamente associados ao diabetes. Esses miRNAs se correlacionaram com variáveis clínicas como triglicerídeos, colesterol, insulina, peso e IMC. Além disso, houve mudanças na expressão de genes relacionados ao metabolismo da glicose e ao sistema IGF, sugerindo que os miRNAs podem ser alvos potenciais para prevenir a progressão de IGR para DM2.

Flowers *et al.* (2021) analisaram a expressão de microRNAs em 82 adultos americanos com pré-diabetes que foram submetidos a um programa de aconselhamento nutricional e atividade física regular ao longo de 12 meses, focando em como esses biomarcadores poderiam prever mudanças na glicemia de jejum. A intervenção incluiu aconselhamento nutricional e atividade física. Os resultados mostraram que três microRNAs (let-7c, miR-363 e miR-374b) foram preditores significativos de glicemia no grupo controle, mas não houve interação relevante com o grupo de intervenção. Além disso, alguns microRNAs, previamente associados ao risco de DM2, também foram preditores de mudanças glicêmicas ao longo do tempo. A variação média da glicemia foi maior no grupo controle, sugerindo que os microRNAs podem ser ferramentas úteis para avaliar respostas às intervenções comportamentais, fornecendo novos insights sobre a etiologia do DM2 e as respostas ao aconselhamento nutricional e à atividade física.

Paramasivam *et al.* (2022) testaram o efeito de modificações na dieta e atividade física durante 4 meses em obesos pré-diabéticos (G1) e comparado a um grupo controle que recebeu apenas recomendações (G2). Os níveis de *miR-128-3p*, *miR-374a-5p*, *miR-221-3p* e *miR-133a-3p* foram alterados apenas no que recebeu intervenção (G1) e foram correlacionados com melhora metabólica (sensibilidade à insulina, níveis de citocinas, circunferência da cintura e pressão arterial sistólica (PAS). Especialmente, o *miR-374a-5p* plasmático correlacionou-se negativamente com a insulina em jejum e as alterações de HOMA-IR.

Além de estudos de expressão, dados de metilação mostram evidências da influência do nível de atividade física na patogênese do DM2. O nível de atividade física foi associado ao risco de DM2. Na análise de modificação de efeito, os efeitos da prática de atividade física sobre o DM2 foram mais fortes quando associados a hipometilação de VDR do que quando associado a hipermetilação deste gene. Os autores sugerem ainda que pessoas com perfil hipometilado de VDR e baixos níveis de atividade física tem maiores riscos de desenvolver DM2. Além disso, os níveis de metilação do VDR foram associados à insulina bem como a resistência à insulina (Yu *et al.*, 2022).

Em um estudo de coorte realizado na Austrália com pacientes com câncer, foi observada uma associação significativa entre a atividade física total, medida pelo IPAQ, e a metilação do DNA no sangue periférico, especificamente em um local CpG do gene da proteína amiloide sérica A (SAA2), cuja proteína traduzida é conhecida por ser induzida por citocinas inflamatórias. Este achado sugere um potencial efeito epigenético da atividade física, pois o nível de atividade foi associado a mudanças na metilação do DNA em um sítio CpG particular. Além disso, embora tenham sido encontradas associações mais fracas entre a atividade física total, a atividade física de lazer e o tempo gasto assistindo televisão com outros locais CpG, essas relações ainda destacam a complexidade dos efeitos da atividade física e dos comportamentos sedentários na metilação do DNA. As mudanças na atividade física de lazer entre a linha de base e o acompanhamento também foram associadas a alterações na metilação de vários locais CpG, sugerindo que variações nos níveis de atividade podem influenciar marcadores epigenéticos e, potencialmente, impactar o desenvolvimento de doenças crônicas (Van-Roekel *et al.*, 2019).

Diniz *et al.* (2021) realizaram um estudo com 200 pacientes de ambos os sexos diagnosticados com DM2, investigando a relação entre a atividade física e o padrão de metilação do gene *MTHFR*. Os resultados indicaram que a atividade física insuficiente estava fortemente associada a um perfil parcialmente metilado desse gene. Especificamente, 85% dos pacientes considerados insuficientemente ativos apresentaram esse padrão de metilação parcial, em comparação a 54% dos pacientes suficientemente ativos. Além disso, essa associação demonstrou ser independente de variáveis como estado nutricional, idade, gênero e outros fatores de risco, sugerindo que o nível de atividade física desempenha um papel crucial no perfil de metilação do gene *MTHFR* em pacientes com DM2, independentemente de outros fatores normalmente considerados determinantes.

De Assis *et al.* (2021) oferecem uma perspectiva significativa ao revelar que o perfil metilado ou parcialmente metilado dos *miRNAs-9-1/9-3* está associado a um estilo de vida

sedentário, aumentando em quase 6 vezes a probabilidade de desenvolvimento de RD. Essa observação sugere fortemente que a metilação, incluindo a do *miR-9-3*, atua como um mecanismo crucial no controle da expressão gênica, mediado pela atividade física. A modificação epigenética pode, portanto, induzir mudanças específicas na resposta transcricional, refletindo a interação complexa entre estilo de vida e predisposição para doenças. Dessa forma, é possível sugerir que a metilação seja um mecanismo de controle da expressão de alguns genes, incluindo o *miR-9-3*, mediado pela atividade física, e que pode eventualmente induzir mudanças específicas na resposta transcricional.

2.4 CONSUMO ALIMENTAR, RETINOPATIA E EPIGENÉTICA

Uma alimentação adequada é fundamental para o controle do DM2 e suas complicações. Apesar de existirem diretrizes nutricionais voltadas para o manejo do diabetes e pré-diabetes, seu impacto no surgimento e avanço da RD ainda não está totalmente esclarecido (Evert *et al.*, 2019). A orientação nutricional focada na melhoria ou controle dos níveis glicêmicos, no alcance de metas relacionadas ao peso corporal e na melhora dos fatores de risco cardiovascular, como pressão arterial e níveis de lipídios, pode ser benéfica para pacientes com RD (Bryl *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2024). Pesquisas indicam uma relação positiva entre mudanças na dieta e a diminuição do risco de desenvolver RD. Dessa forma, a implementação de uma intervenção nutricional em fases iniciais da doença pode ajudar a evitar seu progresso e, assim, reduzir a necessidade de tratamentos mais intensivos (Gilbert *et al.*, 2022).

Além das diretrizes nutricionais, padrões alimentares saudáveis, como a dieta mediterrânea e a dieta DASH (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*), têm demonstrado benefícios significativos na redução da incidência e gravidade de várias doenças crônicas, incluindo DM2 e suas complicações, como a RD (Toi *et al.*, 2020; Schulze *et al.*, 2018). Estudos de revisão indicam que a dieta mediterrânea, caracterizada por alta ingestão de frutas, vegetais e peixes, além da redução calórica, possui um efeito protetor contra o desenvolvimento da RD (Wong *et al.*, 2018).

Kadri *et al.* (2021), em um estudo prospectivo com 261 participantes, associaram o consumo de arroz à maior ocorrência de RD. No entanto, os autores identificaram que pacientes diabéticos que consumiam peixe com mais frequência tiveram um risco significativamente menor de desenvolver RD. Além disso, o consumo frequente de peixe foi associado a formas menos graves da complicação, podendo reduzir o risco de progressão da doença.

Sala-Vila *et al.* (2016), em outro estudo prospectivo, apontaram que o consumo de duas ou mais porções semanais de peixe rico em ômega-3 reduziu a incidência de RD em comparação com aqueles que não consumiam o peixe. De maneira semelhante, Yan *et al.* (2020), em um estudo longitudinal que acompanhou 314 pacientes australianos submetidos à fotocoagulação retiniana, observaram que o maior consumo de queijo e pão integral foi associado a um menor risco de incidência de fotocoagulação retiniana. Esse padrão alimentar foi apontado como um fator que pode reduzir o risco de progressão da RD e minimizar a necessidade de tratamentos invasivos, como a fotocoagulação.

Shah *et al.* (2022), em uma metanálise, constataram a relação entre ingestão alimentar e RD, demonstrando que pacientes que ingeriam maiores quantidades de fibras alimentares, peixes oleosos e adotavam um padrão de dieta mediterrânea apresentavam maior proteção contra a RD. Por outro lado, o consumo de sódio e carboidratos não foi associado à RD, enquanto uma alta ingestão calórica total pode estar relacionada a um maior risco dessa complicação. No entanto, a relação entre RD e o consumo de antioxidantes, ácidos graxos, proteínas, álcool e outras bebidas, como chá e café, foi inconsistente, sugerindo a necessidade de mais pesquisas para compreender melhor essas associações.

Dow *et al.* (2018), também em uma metanálise, investigaram a associação entre RD e a ingestão de frutas, vegetais, peixes, leite, carboidratos, fibras, gorduras, proteínas, sal, potássio, vitaminas C, D e E, carotenóides, suplementos dietéticos, chá verde e álcool. Os estudos analisados sugerem que a adesão à dieta mediterrânea e o alto consumo de frutas, vegetais e peixes podem proteger contra o desenvolvimento de RD. A dieta mediterrânea foi recentemente apontada como um fator protetor, indicando menor risco de RD em indivíduos com DM2. Isso reforça que esse padrão dietético é um dos mais promissores para prevenir RD, especialmente quando inclui azeite de oliva, fibras e cereais como nozes, que podem atenuar as consequências fisiopatológicas das complicações microvasculares do diabetes, como inflamação, estresse oxidativo e resistência à insulina (Francisco *et al.*, 2020).

Estudo transversal conduzido por She *et al.* (2020) investigou a associação da ingestão de vitamina E, selênio e riboflavina em uma amostra de pacientes chineses (n = 455). Os autores constataram um efeito protetor da vitamina E e selênio nos pacientes com RD, em comparação com os controles, e não observaram diferenças entre os grupos quanto ao consumo de riboflavina. Granado-Casas *et al.* (2018), em estudo transversal (n = 243), corroboraram esses achados, indicando que o consumo de vitamina E foi um fator protetor para a RD. Além disso, a ingestão de carboidratos complexos, gordura total, ácidos graxos monoinsaturados e ácido oleico também foi apontada como um fator de proteção para pacientes com RD. Essas

estratégias nutricionais de fato apresentam forte evidência de que podem reduzir o risco de desenvolver RD, demonstrando serem eficazes e uma alternativa aos tratamentos convencionais.

A nutrição especializada surge como um potencial adjuvante no tratamento da RD, sendo uma alternativa não invasiva e de baixo custo, que pode ser adaptada a diferentes níveis socioeconômicos, em contraste com tratamentos mais invasivos e caros, muitas vezes sem indicação a longo prazo devido aos seus efeitos colaterais (Sharma *et al.*, 2017). Além de estar relacionada diretamente ao risco de RD, a alimentação pode exercer um papel modulador sobre fenótipos ligados a alterações genéticas, resultado da interação entre genes e nutrientes (Steemburgo; De Azevedo; Martínez, 2009).

Nesse sentido, a nutrição tem um papel fundamental na patogênese do DM2 e suas complicações crônicas, e a análise das interações entre nutrientes e genes é um passo importante para a compreensão dos mecanismos por trás dessa doença crônica. Uma área promissora, a nutrigenômica, utiliza ferramentas moleculares para investigar como os nutrientes influenciam a expressão de genes e proteínas, bem como a produção de metabólitos (Müller; Kersten, 2003). Essa abordagem fornece uma visão detalhada de como componentes dietéticos comuns podem regular a expressão gênica e impactar os níveis de proteínas, seja por meio de regulação positiva ou negativa (Rana *et al.*, 2016).

Estudos têm demonstrado que a nutrição dietética pode influenciar fatores epigenéticos, como a metilação do DNA. Uma metanálise envolvendo 60 estudos em humanos mostrou que intervenções com dietas de baixo valor energético, suplementos multivitamínicos e ácido fólico são capazes de modificar a metilação global do DNA, com o ácido fólico sendo a intervenção mais frequente e apresentando resultados mais consistentes (Elgendy *et al.*, 2018).

A partir dessa base, podemos direcionar o foco para a relação entre a alimentação e alterações epigenéticas no contexto do DM2 e da RD. Estudos têm explorado como padrões alimentares específicos podem estar associados a modificações epigenéticas que impactam diretamente no desenvolvimento e progressão dessas doenças (De Renzo *et al.*, 2019). Nesse sentido, os compostos dietéticos bioativos, ao afetar direta e indiretamente a atividade gênica, têm sido relacionados a alterações epigenéticas, como metilação do DNA, acetilação de histonas e modulação da expressão de microRNAs em condições fisiológicas e patológicas (Cannataro; Cione, 2022).

Do ponto de vista nutricional, há evidências crescentes que demonstram como componentes dietéticos influenciam a expressão de *miRs* associados à resistência à insulina e ao DM2. Essa interação entre dieta e expressão de *miRs* faz parte do campo da nutrigenômica,

que investiga como os elementos presentes na alimentação podem afetar a expressão gênica e, por consequência, impactar a saúde. Atualmente, é reconhecido que diversos miRNAs, modulados por padrões alimentares, nutrientes, alimentos e polifenóis, desempenham um papel crucial na regulação pós-transcricional de vários componentes da via de sinalização da insulina (Corrales *et al.*, 2023).

Poucos estudos avaliaram a modulação do miR após intervenção nutricional em indivíduos. A maioria dos estudos foi realizada *in vitro* e/ou *in vivo*. Em um modelo animal, foi demonstrado que uma dieta suplementada com 25% de soja por 28 dias promoveu alterações significativas na expressão do miR-145a-5p e miR-455p, em comparação com o grupo controle. Esses miRs foram associados à modulação da expressão do receptor nuclear, da relação glutamina/glutathione, da atividade catalítica e do metabolismo do ferro no fígado (Seclaman *et al.*, 2019).

Outro estudo avaliou o efeito de uma dieta rica em proteínas, óleo de peixe e ômega-3 em camundongos NZ10, predispostos a desenvolver obesidade e DM2. Após 19 semanas de intervenção, houve um aumento na expressão do miR-205 e uma diminuição na expressão dos miRs miR-411, miR-155, miR-335 e miR-142. A expressão diferencial dos miRs foi relacionada ao aumento dos triglicerídeos, do índice aterogênico e à diminuição da glicose (Adi *et al.*, 2016). Esses dados sugerem que a modulação epigenética por meio de nutrientes específicos pode desempenhar um papel na patogênese do DM2 e na progressão da RD.

Em um estudo clínico em humanos, Kahl *et al.* (2019) investigaram a modulação da expressão do miR-192 e miR-375 após intervenção nutricional em pacientes com DM2. Foi identificada uma correlação positiva entre os miR-192 e miR-375 e os níveis plasmáticos de glicose, enquanto a diminuição na expressão desses miRs foi associada a melhorias nos parâmetros glicêmicos após a intervenção. Esses achados sugerem que a intervenção nutricional pode modular a expressão de miRs e, consequentemente, impactar o controle glicêmico em pacientes com DM2.

Com base nessas evidências, podemos afirmar que a nutrição pode desempenhar um papel modulador significativo no desenvolvimento e progressão da RD, em parte devido à sua influência sobre a epigenética e a expressão de miRs. Esses estudos destacam a importância de intervenções nutricionais personalizadas para indivíduos com DM2, considerando tanto o impacto direto na saúde metabólica quanto os efeitos potenciais sobre a expressão gênica e a progressão de complicações como a RD.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS

Este é um estudo transversal de base epidemiológica, vinculado a uma pesquisa maior intitulada: “Caracterização nutricional, metabólica, genética e de conhecimento de portadores de retinopatia diabética.” O projeto faz parte do “Programa Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde – PPSUS”. A amostra foi composta por 170 voluntários de ambos os sexos, atendidos no ambulatório de endocrinologia na Unidade da Visão do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (HULW/UFPB), entre outubro de 2019 e julho de 2022.

Os pacientes foram selecionados com base nos seguintes critérios: diagnóstico prévio de Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), há pelo menos 5 anos e idade mínima de 40 anos. Foram considerados inelegíveis para o estudo os indivíduos com diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1 (DM1), aqueles com menos de cinco anos de diagnóstico de DM2 e participantes com menos de 40 anos de idade.

Foram excluídos do estudo os participantes que não realizaram a coleta de sangue ou o exame de fundo de olho, além daqueles cujas amostras apresentaram quantidade insuficiente de DNA para a análise molecular de metilação.

Após o diagnóstico médico da presença ou ausência de RD, os participantes foram divididos em dois grupos:

Grupo 1: Pacientes com retinopatia diabética (grupo RD). Neste grupo, foram considerados os diferentes estágios da complicação microvascular, incluindo retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) leve, moderada e severa, além da retinopatia diabética proliferativa (RDP).

Grupo 2: Pacientes com diabetes, mas sem retinopatia diabética (grupo S/RD).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (HULW/UFPB), sob CAAE: 99840118.3.0000.5183 e parecer nº 3018211/2018. Foi conduzido de acordo com os padrões éticos da instituição, em conformidade com a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e com a Declaração de Helsinki. Todos os participantes foram devidamente informados sobre os procedimentos envolvidos no estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes de iniciar a participação na pesquisa. Foram esclarecidas quaisquer dúvidas dos participantes quanto aos

riscos, benefícios e a confidencialidade dos dados coletados, garantindo-se que a participação fosse voluntária e consciente.

3.2 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS

Pela manhã, os participantes dirigiram-se ao laboratório especializado para a coleta de sangue, visando à realização de análises bioquímicas e à extração de DNA leucocitário. Posteriormente, os participantes foram encaminhados ao ambulatório de oftalmologia da Unidade da Visão do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW/UFPB) para a realização do exame de fundoscopia. No mesmo dia, foram coletados dados epidemiológicos, história clínica, dados antropométricos, nível de atividade física e o primeiro recordatório alimentar de 24 horas dos participantes. Quinze dias após a coleta do primeiro recordatório alimentar, foi realizado o segundo recordatório alimentar. A figura 4 resume o desenho experimental do estudo.

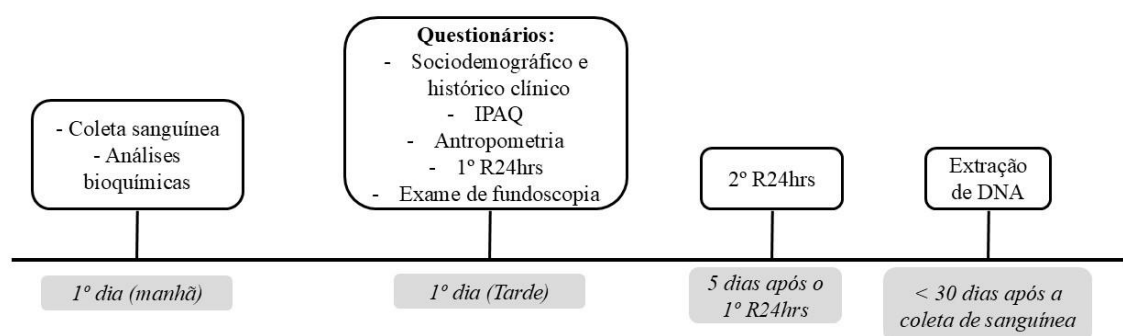


Figura 4: Desenho do estudo

Legenda: IPAQ = Questionário Internacional de Atividade Física; R24hrs = Recordatório Alimentar de 24 horas

3.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA DA RETINOPATIA DIABÉTICA

O diagnóstico de RD foi baseado em oftalmoscopia binocular indireta após dilatação pupilar com tropicamida 0,5%. As imagens da retina, incluindo a mácula e o disco central, foram capturadas em um ângulo de 45° por uma câmera de fundo, e o exame foi realizado por um oftalmologista especialista em retina da Unidade da Visão (HULW). A RD foi diagnosticada como ausente (S/RD), não-proliferativa (RDNP) ou proliferativa (RDP), utilizando como critérios de classificação a Escala Clínica Internacional de Gravidade da Retinopatia Diabética (*International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale*) (Wilkinson *et al.*, 2003).

3.4 QUESTIONÁRIOS SOCIODEMOGRÁFICOS E AVALIAÇÃO CLÍNICA

Foi aplicado um questionário sociodemográfico para coletar informações detalhadas sobre os pacientes, incluindo dados pessoais como idade, sexo, nível de escolaridade, estado civil, e ocupação. Além disso, foram obtidas informações sobre o diagnóstico de diabetes mellitus, como o tempo desde o diagnóstico, histórico familiar da doença e presença de complicações associadas. Também foram registradas variáveis clínicas, como o índice de massa corporal (IMC), histórico de doenças crônicas associadas, como hipertensão e dislipidemia, e o uso de medicamentos. Em relação ao tratamento do DM2 e da RD, foram coletados dados sobre os tipos de intervenções realizadas, como o uso de insulina, antidiabéticos orais, mudanças na dieta, prática de exercícios físicos, e tratamentos específicos para RD, como a fotocoagulação a laser ou terapias anti-VEGF (fator de crescimento endotelial vascular).

A pressão arterial foi aferida utilizando o método auscultatório com um esfigmomanômetro aneroide, conforme as recomendações da VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. A pressão arterial sistólica (PAS) foi considerada elevada quando acima de 140 mmHg, e a pressão arterial diastólica (PAD) quando acima de 80 mmHg, valores utilizados como referência para a classificação de hipertensão arterial (Sociedade Brasileira de Hipertensão, 2020). Além disso, foram realizadas múltiplas aferições para garantir a precisão dos valores medidos, e os pacientes foram instruídos a relaxar antes do procedimento para minimizar a influência de fatores externos nos resultados.

3.5 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA

Massa corporal: Para a mensuração precisa da massa corporal, foi utilizada uma balança digital da marca Omron®, modelo HN-289, com capacidade para medir até 150 kg e precisão de 100 g. Os participantes foram orientados a utilizar roupas leves, removendo itens como cintos, sapatos e acessórios pesados para garantir a precisão das medições. Durante a pesagem, os indivíduos mantiveram-se descalços, em postura ereta, com os pés paralelos e inteiramente apoiados na plataforma da balança. Os braços foram mantidos relaxados ao longo do corpo, e foram feitas múltiplas medições para assegurar a consistência dos resultados. O ambiente da pesagem foi controlado, evitando-se superfícies irregulares e fatores que pudessem interferir no peso registrado (Brasil, 2011).

Estatura: A altura foi medida com o uso de um estadiômetro portátil da marca Sany®, seguindo procedimentos padronizados para garantir a acurácia dos dados. Os participantes

foram instruídos a se posicionarem de costas para o estadiômetro, com os pés juntos e os calcanhares tocando a base do equipamento. A posição anatômica correta, com o plano de Frankfurt alinhado, foi observada para que a cabeça estivesse nivelada, evitando inclinações que poderiam comprometer a medida. Antes da medição, os participantes foram orientados a remover sapatos, chapéus, bonés e, no caso das mulheres, a soltarem os cabelos para evitar qualquer aumento artificial da altura. O processo foi realizado com calma, garantindo que os participantes estivessem completamente relaxados e em postura natural durante a medição.

Índice de Massa Corporal (IMC): O IMC foi calculado utilizando a fórmula padrão peso (em quilogramas) dividido pela altura (em metros) ao quadrado. Os participantes foram então classificados conforme os pontos de corte estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para adultos e idosos (World Health Organization, 2000). As categorias de classificação incluíram: baixo peso (IMC abaixo de 18,5), IMC adequado ou eutrófico (18,5 a 24,9), sobrepeso (25,0 a 29,9) e obesidade (acima de 30,0).

Tabela 2. Classificação do Índice de Massa Corporal

IMC	Classificação
<18,5	Baixo peso
18,5 a 24,9	Eutrofia
Idosos a partir de 60 anos	
25,0 a 29,9	Excesso de peso
30,0 a 34,9	Obesidade de Grau 1
35,0 a 39,9	Obesidade de Grau 2
≥ 40,0	Obesidade de Grau 3

Fonte: World Health Organization (2000)

Relação Cintura/Quadril (RCQ): A Relação Cintura/Quadril (RCQ) foi calculada pela razão entre a medida da circunferência da cintura e a circunferência do quadril. A RCQ foi considerada alterada quando o valor era igual ou superior a 0,90 para homens e 0,85 para mulheres (Who, 2008). Para realizar as medições, foi utilizada uma fita métrica inextensível da marca Sanny®, com escala de 0 a 200 cm e precisão de 0,1 cm. As medidas foram obtidas com os participantes em pé, com abdômen e braços relaxados ao lado do corpo, garantindo uma leitura precisa e consistente.

Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ): O nível de atividade física dos participantes foi avaliado por meio do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ)

versão curta, referente a uma semana normal (Matsudo *et al.*, 2001). Este instrumento, validado para a população brasileira, é amplamente utilizado internacionalmente. O IPAQ permite estimar o tempo semanal gasto em atividades físicas nos domínios do trabalho, lazer, transporte e tarefas domésticas (Benedetti; Antunes; Rodriguez-Añez, 2007). Para analisar o nível habitual de atividade física dos participantes com base no IPAQ, foi considerado o total de minutos por semana dedicados a atividades físicas moderadas e vigorosas em cada domínio. A interpretação dos níveis de atividade física seguiu as recomendações que indicam benefícios para a saúde, classificando como “ativos” os indivíduos que praticam pelo menos 150 minutos por semana de atividade física moderada ou vigorosa (ACSM, 2020).

3.6 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

Foi utilizado o recordatório alimentar de 24 horas que é uma metodologia utilizada para identificar e quantificar todos os alimentos e bebidas ingeridos nas 24 horas anteriores à entrevista, sendo mais frequentemente aplicado para o dia anterior (Gibson, 2005). Para garantir a precisão dos dados, o recordatório foi realizado 2 vezes ao longo da semana, incluindo um registro referente a um dia de semana e outro a um dia de final de semana. Esses recordatórios foram administrados por um nutricionista treinado. Durante o preenchimento do recordatório, os participantes foram instruídos a fornecer informações detalhadas, incluindo a hora do consumo, a identificação dos alimentos e bebidas, características específicas como tipo, ingredientes das preparações, marca, forma de preparo e quantidade consumida, utilizando medidas caseiras e tamanhos de porção.

Os dados coletados foram analisados por um nutricionista treinado com o auxílio do software de nutrição Brasil Nutri®. As informações extraídas incluíram calorias totais, macronutrientes, micronutrientes e o dos alimentos e bebidas relatados. Para análise estatística, os dados dos recordatórios foram tabulados em uma planilha do Excel®, e a média aritmética foi calculada. A ingestão regular de energia e nutrientes foi estimada pelo método de múltiplas fontes (MSM). Este método é adequado para estimar a ingestão habitual individual no caso de medições repetidas e um período de tempo definido.

3.7 COLETA SANGUÍNEA E ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Vinte mL de sangue venoso foram coletados por enfermeira treinada e acondicionados

em tubos na presença de EDTA para extração de DNA e dosagem de HbA1C e na ausência de anticoagulante em tubo contendo ativador de coágulos para obtenção do soro para as dosagens bioquímicas. Em seguida, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 RPM por 15 minutos para obtenção de soro ou plasma e transferidos para microtubos de 2 µL e refrigerados a -20°C para posteriores análises.

Para as determinações bioquímicas foram realizados: glicemia de jejum, colesterol total (COL), lipoproteína de alta densidade (HDL-c), lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), triglicerídeos (TG), creatinina e hemoglobina glicada (HbA1c). Todas as análises foram realizados em analisador automatizado (Selectra XL Flexor) utilizando kit padronizado e seguindo as orientações recomendadas pelo fabricante (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, MG, Brasil). A concentração de LDL foi determinada pela fórmula de Friedewald, onde: $[LDL] = [colesterol\ total] - [HDL] - [triglicerídeos \div 5]$ (Friedewald; Levy; Fredrickson, 1972).

A análise da atividade antioxidante foi realizada utilizando a capacidade antioxidante total (TAC). A TAC foi determinada utilizando o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Neste método, uma alíquota de 1,25 mg de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) foi dissolvida em 100 mL de etanol absoluto (99,5%) e mantida sob refrigeração, protegida da luz. Em seguida, 3,9 mL da solução de DPPH foram adicionados a 50 µL de plasma em tubos de ensaio. Os tubos foram agitados em vórtex e deixados em repouso por 30 minutos. Após esse período, foram centrifugados a 10.000 g, a 20°C, por 15 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para a leitura em um espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Curitiba, Brasil) a um comprimento de onda de 515 nm. Os resultados foram expressos como percentual da atividade antioxidante (AOA): $AOA = 100 - \frac{[DPPH \cdot R]_t}{[DPPH \cdot R]_B} \times 100$ onde, $[DPPH \cdot R]_t$ e $[DPPH \cdot R]_B$ correspondem às concentrações de DPPH• remanescente após 30 minutos, avaliadas na amostra (t) e no branco (B) preparado com água destilada.

A análise de Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (VEGF-A) foi realizada de acordo com metodologia de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) utilizando um kit comercial (Human VEGF-A ELISA Kit RAB0507, Millipore, Saint Louis, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O soro dos pacientes e os padrões foram incubados em uma placa de 96 poços sensibilizada com anticorpos anti-VEGF por 2,5 horas à temperatura ambiente. Após a incubação inicial, as placas foram lavadas e incubadas por uma hora adicional com um anticorpo de detecção biotinizado. Em seguida, foi adicionado um complexo enzimático de avidina-peroxidase (avidina-HRP) e incubado por 30 minutos. Após o período de incubação com o complexo enzimático, foi adicionado um substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A reação foi interrompida após 15 minutos com ácido

fosfórico 1N e a leitura da absorvância foi realizada em um leitor de microplaca a 450 nm. A sensibilidade mínima do ensaio para VEGF-A foi de 10 pg/mL, e a faixa linear da curva padrão foi de 8,23 a 6000 pg/mL. A concentração de VEGF-A foi calculada utilizando a curva padrão obtida.

3.8 ANÁLISE DE METILAÇÃO DO DNA

A análise de metilação foi realizada através do DNAs de leucócitos previamente extraídos utilizando kit comercial GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific). Foi realizado método de PCR Específica para Metilação (MethylationSpecific PCR - MSP), cujo princípio está em transformar citosina não metilada em uracila sem provocar alteração em citosina metilada, através do bissulfito de sódio (Herman *et al.*, 1996). Para tanto, foi utilizado o kit EpiJET Bisulfite Conversion Kit (Thermo Scientific), respeitando-se as recomendações do fabricante. As diferenças nas sequências após tratamento do DNA foram detectadas pela técnica da PCR utilizando Dream Taq™ Hot Start (Thermo Fisher Scientific) e primers específicos para sequências metiladas e não metiladas, para o *miR-9-3* (Wang *et al.*, 2013) e seguindo as condições específicas de PCR de acordo com outros autores (Dos Santos Nunes *et al.*, 2018). Após a amplificação, 7 µl das amostras de PCR foram aplicadas e a eletroforese realizada em gel de agarose a 3% com gel red (Biotium). As bandas de DNA foram visualizadas em transluminador ultravioleta. Como controle positivo, foram utilizados DNA totalmente metilado e totalmente desmetilado (Cells- to-CpG™ Methylated & Unmethylated DNA Control Kit, Life Technologies).

Tabela 3. Sequências dos iniciadores e condições da PCR específica para metilação do DNA do gene-9-3.

Gene	Primer 3'-5' (F/R)	Temperatura de anelamento (°C)	Quantidade de ciclos	Produto (pb)
miR-9-3	ATTGGTCGATTTTTGGATTGAC (M)	58 (1 min)	35	116
	CGCTTAAAAACCTCGAACG (M)			
	GATTGGTTGATTTTTGGATTGAT (U)	55 (1 min)		
	CAAAACACTTAAAAACCTCAAACA (U)			

Legenda: M = Sequência do primer metilada; U = Sequência do primer não metilada; pb = Pares de bases.

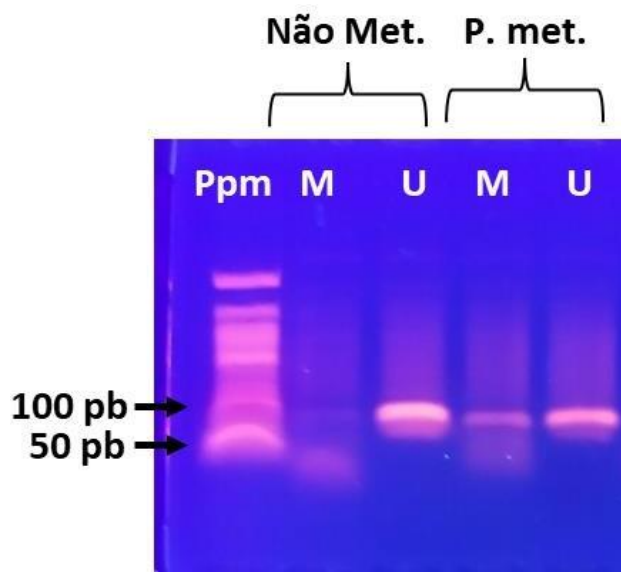


Figura 5: Gel de agarose de metilação do *miR-9-3*.

Legenda: Não met = não metilado; P. met. = Parcialmente metilado; Ppm = Padrão de peso molecular; M = methylated; U = unmethylated; pb = pares de base

Fonte: dados da pesquisa (2023).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média, desvio padrão (DP) ou mediana com intervalos de confiança de 95% para variáveis contínuas, e frequência absoluta e relativa para variáveis categóricas. A normalidade dos dados contínuos foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação entre os grupos, foram utilizados o teste t de Student independente ou o teste de Mann-Whitney (para variáveis contínuas) e o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher (para variáveis categóricas). As variáveis Idade, Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Índice de Massa Corporal (IMC), Relação Cintura-Quadril (RCQ), Colesterol Total (CT) e Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) foram consideradas não paramétricas, enquanto Duração do DM2, Glicose, Hemoglobina Glicada (HbA1c), Creatinina, Triglicerídeos (TG) e Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) foram tratadas como variáveis paramétricas.

Para verificar a razão de chances (*odds ratio*) da metilação do *miR-9-3* na RD, foi utilizada regressão logística binária. Os modelos foram selecionados com base em um critério hierárquico, considerando tanto os resultados dos testes estatísticos de comparação entre grupos quanto a relevância clínica das variáveis para o desfecho principal (RD e RDP - retinopatia diabética proliferativa). A variável dependente foi RD ou RDP, e a variável independente foi a hipermetilação do *miR-9-3*. As variáveis de ajuste/confusão incluíram tratamento com insulina,

sexo masculino, TG, HDL e creatinina.

Para analisar a influência da atividade física na metilação na RD, foi utilizado outro modelo de regressão logística, com a metilação como variável dependente, e o nível de atividade física como variável independente. As variáveis de ajuste/confusão incluíram :tratamento com insulina, sexo feminino, TG, HDL e creatinina. Os pressupostos de colinearidade foram rigorosamente testados e respeitados. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados utilizando o software SPSS versão 26 (IBM SPSS, Chicago, IL, EUA), e as figuras gráficas foram geradas utilizando o software GraphPad Prism versão 8 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

Os resultados desta tese estão apresentados na forma de 2 artigos. O 1º artigo original consta como (APÊNDICE A).

O artigo intitulado: “*MiR-9-3 hypermethylation is associated with stages of diabetic retinopathy*” teve como principais resultados:

- A hipermetilação do *miR-9-3* foi significativamente mais elevada no grupo com retinopatia diabética (DR), especialmente no subgrupo com retinopatia proliferativa (PDR), em comparação ao grupo controle de DM2;
- Não houve diferença significativa de hipermetilação entre o grupo controle de DM2 e o grupo com retinopatia não proliferativa (NPDR);
- A hipermetilação do *miR-9-3* foi associada a um risco aumentado de desenvolvimento de DR e PDR;
- Nos subgrupos com DR e NPDR, a hipermetilação do *miR-9-3* foi relacionada a níveis mais elevados de VEGF-A no soro, sugerindo uma ligação com a angiogênese.

O 2º artigo consta como (APÊNDICE B) intitulado: “*Physical activity levels influence miR-9-3 methylation in Diabetic Retinopathy*”. Os principais resultados do artigo foram:

- Atividade física insuficiente foi identificada como fator de risco para a metilação do *miR-9-3*;
- A maior capacidade antioxidante total (CAT) foi considerada uma variável protetora contra a metilação do *miR-9-3*;
- Esses efeitos foram observados independentemente de outras variáveis de ajuste,

reforçando a influência da atividade física e da capacidade antioxidante na regulação epigenética do *miR-9-3*.

O 3º artigo consta com (APÊNDICE C) intitulado: “*Carbohydrate intake is associated with miR-9-3 methylation in patients with Diabetic Retinopathy*”. Os principais resultados do artigo foram:

- A ingestão de carboidratos, sódio, tiamina e riboflavina foi maior no grupo RD nos pacientes metilados;
- A maior ingestão de carboidratos mostrou-se como um fator de risco para a metilação de *miR-9-3* independente das covariáveis de ajuste.

REFERÊNCIAS

- ABU-YAGHI, N. E. et al. Relationship between serum vascular endothelial growth factor levels and stages of diabetic retinopathy and other biomarkers. **Journal of Ophthalmology**, 2020, p. 8480193, 2020.
- ADI, N. et al. High protein/fish oil diet prevents hepatic steatosis in NONcNZO10 mice; association with diet/genetics-regulated micro-RNAs. **Journal of diabetes & metabolism**, v. 7, n. 6, 2016.
- AHMED, A. S. H. et al. The role of DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Clinical Epigenetics**, v. 12, n. 104, p. 1–23, 2020.
- AL-MUHTARESH, H. A.; AL-KAJAJI, G. Evaluation of two-diabetes related microRNAs suitability as earlier blood biomarkers for detecting prediabetes and type 2 diabetes mellitus. **Journal of Clinical Medicine**, v. 7, n. 2, p. 12, 2018.
- ALATTAS, K. et al. Relation between lipid profile, blood pressure and retinopathy in diabetic patients in King Abdulaziz University hospital: a retrospective record review study. **International Journal of Retina and Vitreous**, v. 8, n. 1, 2022.
- ALQABANDI, Y. et al. Physical activity status and diabetic retinopathy: a review. **Cureus**, v. 14, n. 8, p. e28238, 2022.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2. Diagnosis and classification of diabetes: standards of care in diabetes—2024. **Diabetes Care**, v. 47, n. Supplement_1, p. S20-S42, 2024.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION; Standards of Medical Care in Diabetes—2019 Abridged for Primary Care Providers. **Clinical Diabetes**, 37. n.1, p. 11–34, 2019.
- ANGELESCU, M. A. et al. miRNAs as biomarkers in diabetes: moving towards precision medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, 2022.
- ANTONETTI, D. A.; SILVA, P. S.; STITT, A. W. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 17, n. 4, p. 195-206, 2021.
- ARAMBEWELA, M. H. et al. Prevalence of chronic complications, their risk factors, and the cardiovascular risk factors among patients with type 2 diabetes attending the diabetic clinic at a tertiary care hospital in Sri Lanka. **Journal of Diabetes Research**, v. 2018, 2018.
- ARÃO, T. C. et al. Increased miRNA-146a and miRNA-155 expressions in oral lichen planus. **Archives of Dermatological Research**, v. 304, n. 5, p. 371–375, 2012.
- ASSOCIATION AMERICAN DIABETES. 2. Diagnosis and classification of diabetes: standards of care in diabetes—2024. **Diabetes Care**, v. 47, n. Supplement_1, p. S20-S42, 2024.
- BENEDETTI, T. R. B.; ANTUNES, P. D. C.; RODRIGUEZ-AÑEZ, C. R. Reproducibility

and validity of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) in elderly men. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 1, p. 9–13, 2007.

BENNASAR-VENY, M. et al. Lifestyle and progression to type 2 diabetes in a cohort of workers with prediabetes. **Nutrients**, v. 12, n. 5, 2020.

BERGER, S. L. et al. An operational definition of epigenetics. **Genes and Development**, v. 23, n. 7, p. 781–783, 2009a.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396–398, 2007.

BIRD, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature**, v. 321, n. 6067, p. 209–213, 1986.

BJORNSTAD, P. et al. Long-term complications in youth-onset type 2 diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 5, p. 416–426, 2021.

BLOND, K. et al. Association of high amounts of physical activity with mortality risk: a systematic review and meta-analysis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 54, n. 20, p. 1195–1201, 2020.

BORDONE, L. et al. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic β cells. **PLoS Biology**, v. 4, n. 2, p. 210–220, 2006.

BRASIL. VIGITEL BRASIL 2023: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: Estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2023 [s.l: s.n.], 2023.

BRYL, A. et al. The effect of diet and lifestyle on the course of diabetic retinopathy—a review of the literature. **Nutrients**, v. 14, n. 6, p. 1252, 2022.

CAI, C. et al. DNA methylation in diabetic retinopathy: pathogenetic role and potential therapeutic targets. **Cell & Bioscience**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2022.

CANNATARO, R.; CIONE, E. Diet and miRNA: Epigenetic Regulator or a New Class of Supplements? **Microrna**, v. 11, n. 2, p. 89-90, 2022.

CARDOSO, C. R. L. et al. Predictors of Development and Progression of Retinopathy in Patients with Type 2 Diabetes: Importance of Blood Pressure Parameters. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

CHAGAS, T. A. et al. Prevalence of diabetic retinopathy in Brazil: a systematic review with meta-analysis. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 15, n. 1, p. 34, 2023.

CHAKRABORTTY, A. et al. miRNAs: potential as biomarkers and therapeutic targets for cancer. **Genes**, v. 14, n. 7, p. 1375, 2023.

CHANG, X. et al. miRNA, lncRNA and circRNA: targeted molecules full of therapeutic prospects in the development of diabetic retinopathy. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p.

1–13, 2021.

CHEN, M. et al. STAT3 activation in circulating myeloid-derived cells contributes to retinal microvascular dysfunction in diabetes. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2019.

CHEN, Y.; ZHU, Y.; ZHAO, S. MiR-10b alleviates high glucose-induced human retinal endothelial cell injury by regulating TIAM1 signaling. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 8, p. 1577–1583, 2020.

CHI, T. et al. Non-coding RNA as biomarkers for type 2 diabetes development and clinical management. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 1–9, 2021.

COLE, J. B.; FLOREZ, J. C. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, n. 7, p. 377–390, 2020.

COPPOLA, T. et al. Pancreatic β -cell protein granuphilin binds Rab3 and Munc-18 and controls exocytosis. **Molecular biology of the cell**, v. 13, n. 6, p. 1906–1915, 2002.

CORRALES, P. et al. microRNAs-mediated regulation of insulin signaling in white adipose tissue during aging: Role of caloric restriction. **Aging Cell**, v. 22, n. 11, p. e13919, 2023.

CORDERO, P.; LI, J.; OBEN, J. A. Epigenetics of obesity: beyond the genome sequence. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 18, n. 4, p. 361–366, 2015.

CORRÊA, T. A. F.; ROGERO, M. M. Diabetes, microRNA, and Nutrition in Geriatrics. **Current Geriatrics Reports**, v. 9, p. 229–236, 2020.

CURRAN, M. et al. The benefits of physical exercise for the health of the pancreatic β -cell: a review of the evidence. **Experimental Physiology**, v. 105, n. 4, p. 579–589, 2020.

DEBELE, G. R. et al. Incidence of diabetic retinopathy and its predictors among newly diagnosed type 1 and type 2 diabetic patients: a retrospective follow-up study at tertiary health-care setting of Ethiopia. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 14, p. 1305–1313, 2021.

DE ASSIS, C. S. et al. Methylation profile of miR-9-1 and miR-9-1/-9-3 as potential biomarkers of diabetic retinopathy. **Current Diabetes Reviews**, v. 17, 2021.

DINIZ, T. G. et al. Physical activity level influences MTHFR gene methylation profile in diabetic patients. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 618672, 2021.

DIRANI, M.; CROWSTON, J. G.; WIJNGAARDEN, P. V. Physical inactivity as a risk factor for diabetic retinopathy? A review. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v. 42, n. 6, p. 574–581, 2014.

DONG, N.; WANG, Y. MiR-30a regulates S100A12-induced retinal microglial activation and inflammation by targeting NLRP3. **Current Eye Research**, v. 44, n. 11, p. 1236–1243, 2019.

DOS SANTOS NUNES, M. K. et al. Analysis of the DNA methylation profiles of miR-9-3,

miR-34a, and miR-137 promoters in patients with diabetic retinopathy and nephropathy. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 32, n. 6, p. 593–601, 2018.

DOW, C. et al. Diet and risk of diabetic retinopathy: a systematic review. **European Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 2, p. 141–156, 2018.

DU, H. et al. The role of miR-320 in glucose and lipid metabolism disorder-associated diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 2, p. 402–416, 2021.

ELGENDY, K. et al. Effects of dietary interventions on DNA methylation in adult humans: systematic review and meta-analysis. **British Journal of Nutrition**, v. 120, n. 9, p. 961–976, 2018.

EVERT, A. B. et al. Nutrition therapy for adults with diabetes or prediabetes: a consensus report. **Diabetes care**, v. 42, n. 5, p. 731, 2019.

FACHIM, H. A. et al. Circulating microRNA changes in patients with impaired glucose regulation. **Adipocyte**, v. 9, n. 1, p. 443–453, 2020.

FAN, W. Y. et al. Association of candidate gene polymorphisms with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. **International Journal of Ophthalmology**, v. 13, n. 2, p. 301, 2020.

FELDMAN, E. L. et al. Diabetic neuropathy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 41, 2019.

FERRARA, N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. **Mechanisms of Angiogenesis**, n. 94, p. 209–231, 2005.

FLOWERS, E. et al. Circulating MicroRNAs predict glycemic improvement and response to a behavioral intervention. **Biomarker research**, v. 9, p. 1–9, 2021.

FRANCISCO, S. G. et al. Dietary patterns, carbohydrates, and age-related eye diseases. **Nutrients**, v. 12, 2020.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499–502, 1972.

FUKUDA, M. Rab27 and its effectors in secretory granule exocytosis: a novel docking machinery composed of a Rab27 · effector complex. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. 5, p. 691–695, 2006.

FUZIWARA, C. S.; KIMURA, E. T. MicroRNA deregulation in anaplastic thyroid cancer biology. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, 2014.

GANGNON, R. E. et al. A severity scale for diabetic macular edema developed from ETDRS data. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 49, n. 11, p. 5041–5047, 2008.

GIBSON, R. S. Principles of nutritional assessment. 2. ed. [s.l.: s.n.].

GUILBERT, E. et al. Short-term effectiveness of nutrition therapy to treat type 2 diabetes in low-income and middle-income countries: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **BMJ open**, v. 12, n. 3, p. e056108, 2022.

GRANADO-CASAS, M. et al. Type 1 diabetic subjects with diabetic retinopathy show an unfavorable pattern of fat intake. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1184, 2018.

GUNAY, M.; SEKEROGLU, M. A.; CELIK, G. Anterior segment ischemia following diode laser photocoagulation for aggressive posterior retinopathy of prematurity. **Journal of Ophthalmology**, p. 845–848, 2015.

GUPTA, P. et al. Six-year incidence and systemic associations of retinopathy in a multi-ethnic Asian population without diabetes. **British Journal of Ophthalmology**, v. 106, n. 6, p. 845–851, 2022.

HAYASHI, N.; IKEMURA, T. Effects of dynamic exercise and its intensity on ocular blood flow in humans. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 10, p. 2601–2606, 2011.

HE, L.; HANNON, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 7, p. 522–531, jul. 2004.

HELAL, H. G. et al. MicroRNAs (–146a, –21 and –34a) are diagnostic and prognostic biomarkers for diabetic retinopathy. **Biomedical Journal**, v. 44, n. 6, p. S242–S251, 2021.

HERNÁNDEZ-ALONSO, P. et al. Chronic pistachio intake modulates circulating microRNAs related to glucose metabolism and insulin resistance in prediabetic subjects. **European journal of nutrition**, v. 56, p. 2181-2191, 2017.

HILDEBRANDT, M. A. T. et al. Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma. **Oncogene**, v. 29, n. 42, p. 5724–5728, 2010.

HOU, L. et al. Exercise modalities for type 2 diabetes: a systematic review and network meta-analysis of randomized trials. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 39, n. 1, p. e3591, 2023.

HU, D. et al. Identification of miR-9 as a negative factor of insulin secretion from beta cells. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 74, n. 2, p. 291–299, 2018.

HUPPI, K. et al. MicroRNAs and genomic instability. **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, n. 1, p. 10–16, 2007.

INBAR-FEIGENBERG, M. et al. Basic concepts of epigenetics. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 3, p. 607–15, 2013.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. International Diabetes Federation. [s.l.: s.n.], v. 102, p. 147–148. 2021.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic Regulation of Gene expression: How the Genome Integrates Intrinsic and Environmental Signals. **Nature Genetics**, v. 33, n. S3, p. 245–254, 2003.

JIMÉNEZ-LUCENA, R. et al. Circulating miRNAs as predictive biomarkers of type 2 diabetes mellitus development in coronary heart disease patients from the CORDIOPREV study. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 12, p. 146–157, 2018.

KADIYALA, C. S. R. et al. Acetylation of retinal histones in diabetes increases inflammatory proteins: effects of minocycline and manipulation of histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 31, p. 25869–25880, 2012.

KADRI, R. et al. Dietary associations with diabetic retinopathy—a cohort study. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 69, n. 3, p. 661, 2021.

KAUR, P. et al. miRNA signatures in diabetic retinopathy and nephropathy: delineating underlying mechanisms. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 19–37, 2022.

KIM, B. G. et al. Mechanical compression induces VEGFA overexpression in breast cancer via DNMT3A-dependent miR-9 downregulation. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 3, p. e2646–e2646, 2017.

KIM, T.; CROCE, C.M. MicroRNA: trends in clinical trials of cancer diagnosis and therapy strategies. **Experimental & molecular medicine**, v. 55, n. 7, p. 1314–1321, 2023.

KHABAN, P. A. et al. Microvascular complications and their associated risk factors in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 11, n. 1, p. 4–8, 2017.

KHALIL, H. Diabetes microvascular complications—a clinical update. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 11, p. S133–S139, 2017.

KLEMP, I. et al. DNA methylation patterns reflect individual's lifestyle independent of obesity. **Clinical and Translational Medicine**, v. 12, n. 6, p. e851, 2022.

KOBAYASHI, M.; ZOCHODNE, D. W. Diabetic neuropathy and the sensory neuron: new aspects of pathogenesis and their treatment implications. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 9, n. 6, p. 1239–1254, 2018.

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

KORDKHEYLI, V. A. et al. MicroRNAs may provide new strategies in the treatment and diagnosis of diabetic retinopathy: importance of VEGF. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 24, n. 4, p. 267–279, 2021.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693–705, 2007.

KOWLURU, R. A.; MOHAMMAD, G. Epigenetic modifications in diabetes. **Metabolism**, v. 126, p. 154920, 2022.

KOWLURU, R. A.; SANTOS, J. M.; MISHRA, M. Epigenetic modifications and diabetic retinopathy. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

KRAMNA, D.; RIEDLOVA, P.; JIRIK, V. MicroRNAs as a potential biomarker in the diagnosis of cardiovascular diseases. **Medicina**, v. 59, n. 7, p. 1329, 2023.

KUFE, C. N. et al. Physical behaviors and their association with type 2 diabetes mellitus risk markers in urban South African middle-aged adults: an isotemporal substitution approach. **BMJ Open Diabetes Research and Care**, v. 10, n. 4, 2022.

JIANG, B. et al. MiR-181a-5p may regulate cell proliferation and autophagy in myopia and the associated retinopathy. **Experimental Eye Research**, v. 241, p. 109829, 2024.

LACHIN, J. M. et al. Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the diabetes control and complications trial-revisited. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p. 995-1001, 2008.

LEE, C. Y. et al. miRNAs as therapeutic tools in Alzheimer's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 13012, 2021.

LI, S. et al. The role of microRNAs in neurodegenerative diseases: a review. **Cell Biology and Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 53-83, 2023.

LI, Y. et al. Metabolic syndrome is associated with altered mRNA and miRNA content in human circulating extracellular vesicles. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, n. 8, p. 1–10, 2021.

LIU, W. L. MicroRNA-9 inhibits retinal neovascularization in rats with diabetic retinopathy by targeting vascular endothelial growth factor A. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 5, p. 8032-8043, 2019.

LIU, Y. et al. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells: identification of a 5' enhancer. **Circulation Research**, v. 77, n. 3, p. 638-643, 1995.

LIU, L. et al. Hypertension, blood pressure control and diabetic retinopathy in a large population-based study. **PloS One**, v. 15, n. 3, 2020.

LIU, Y. et al. microRNA-216a protects against human retinal microvascular endothelial cell injury in diabetic retinopathy by suppressing the NOS2/JAK/STAT axis. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 115, p. 104445, 2020.

LIU, Y. et al. MicroRNA-9 as a paradoxical but critical regulator of cancer metastasis: implications in personalized medicine. **Genes & Diseases**, v. 8, n. 6, p. 759–768, 2021.

LU, J. M. et al. Repression of microRNA-21 inhibits retinal vascular endothelial cell growth

and angiogenesis via PTEN dependent-PI3K/Akt/VEGF signaling pathway in diabetic retinopathy. **Experimental Eye Research**, v. 190, p. 107886, 2020.

LUO, M. et al. Accelerometer-measured intensity-specific physical activity, genetic risk and incident type 2 diabetes: a prospective cohort study. **British Journal of Sports Medicine**, v. 57, n. 19, p. 1257-1264, 2023.

LUO, Y. F. et al. MicroRNA-139-5p upregulation is associated with diabetic endothelial cell dysfunction by targeting c-jun. **Aging**, v. 13, n. 1, p. 1186–1211, 2021.

MA, L. et al. Circulating microRNAs as potential diagnostic biomarkers for diabetic retinopathy: a meta-analysis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 929924, 2022.

MA, Y. et al. Silencing of mir-20b-5p exerts inhibitory effect on diabetic retinopathy via inactivation of thbs1 gene induced vegf/akt/pi3k pathway. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 14, p. 1183–1193, 2021.

MACK, G. S. MicroRNA gets down to business. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 631–638, 2007.

MADELAINE, R. et al. MicroRNA-9 couples brain neurogenesis and angiogenesis. **Cell Reports**, v. 20, p. 1533-1542, 2017.

MANNAR, V. et al. Epigenetics of Pathogenesis and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. **touchREVIEWS in Endocrinology**, v. 19, n. 1, p. 46–53, 2023.

MARTINEZ, B.; PELOW, P. MicroRNAs as biomarkers of diabetic retinopathy and disease progression. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 11, p. 1858–1869, 2019.

MARTINEZ-ZAPATA, M. J. et al. Anti-vascular endothelial growth factor for proliferative diabetic retinopathy. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2014, n. 11, p. CD008721, 2014.

MASTROPASQUA, R. et al. Serum microRNA levels in diabetes mellitus. **Diagnostics**, v. 11, n. 2, p. 1–12, 2021.

MATSUDO, S. et al. Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde**, v. 6, n. 2, p. 5–18, 2001.

MAUGERI, A.; BARCHITTA, M. How dietary factors affect DNA methylation: lesson from epidemiological studies. **Medicina**, v. 56, n. 8, p. 1–26, 2020.

MONAMI, M. et al. Improvement of glycemic control in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases**, v. 31, n. 9, p. 2539–2546, 2021.

MORTUZA, R.; FENG, B.; CHAKRABARTI, S. MiR-195 regulates SIRT1-mediated changes in diabetic retinopathy. **Diabetologia**, v. 57, n. 5, p. 1037–1046, 2014.

MOTAWAE, T. M. et al. MicroRNAs 9 and 370 association with biochemical markers in T2D and CAD complication of T2D. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126957, 2015.

MOYNIHAN, K. A. et al. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic β cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. **Cell Metabolism**, v. 2, n. 2, p. 105–117, 2005.

MU, X. et al. Associations of physical activity intensity with incident cardiovascular diseases and mortality among UK adults. **The International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity**, v. 19, n. 1, 2022.

MÜLLER, M.; KERSTEN, S. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 4, p. 315–322, 2003.

MZIAUT, H. et al. MiR-132 controls pancreatic beta cell proliferation and survival through Pten/Akt/Foxo3 signaling. **Molecular Metabolism**, v. 31, p. 150–162, 2020.

OLIOSO, D. et al. Effects of aerobic and resistance training on circulating micro-RNA expression profile in subjects with type 2 diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 104, n. 4, p. 1119–1130, 2019.

ORTIZ-MARTÍNEZ, M, et al. Recent developments in biomarkers for diagnosis and screening of type 2 diabetes mellitus. **Current diabetes reports**, v. 22, n. 3, p. 95-115, 2022.

PARAMASIVAM, P. et al. Blood-derived miRNA levels are not correlated with metabolic or anthropometric parameters in obese pre-diabetic subjects but with systemic inflammation. **PLOS ONE**, v. 17, n. 2, p. 1–14, 2022.

PÁRRIZAS, M. et al. Circulating miR-192 and miR-193b are markers of prediabetes and are modulated by an exercise intervention. **The journal of clinical endocrinology & metabolism**, v. 100, n. 3, p. E407-E415, 2015.

PEREIRA, D. M. et al. Quality of life in people with diabetic retinopathy: Indian study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 4, p. NC01, 2017.

PEPLOW, P.; MARTINEZ, B. Altered microRNA expression in animal models of Huntington's disease and potential therapeutic strategies. **Neural Regeneration Research**, v. 16, n. 11, p. 2159, 2021.

PLAISANCE, V. et al. MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 37, p. 26932–26942, 2006.

PLATANIA, C. B. M. et al. Retinal and circulating miRNA expression patterns in diabetic retinopathy: an in silico and in vivo approach. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 13, p. 2179–2194, 2019.

POKHAREL, D. R. et al. Evaluation of circulating plasma miR-9, miR-29a, miR-192, and miR-375 as potential biomarkers for predicting prediabetes and type 2 diabetes in Nepali adult population. **Non-coding RNA Research**, v. 9, n. 4, p. 1324-1332, 2024.

PRAIDOU, A. et al. Physical activity and its correlation to diabetic retinopathy. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 31, n. 2, p. 456–461, 2017.

QIAN, J. et al. Male sex increases the risk of diabetic retinopathy in an urban safety-net hospital population without impacting the relationship between axial length and retinopathy. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–5, 2022.

QIN, B. et al. MiR-20b targets AKT3 and modulates vascular endothelial growth factor-mediated changes in diabetic retinopathy. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 48, n. 8, p. 732–740, 2016.

QIU, F. et al. Inhibition of miR-21-5p suppresses high glucose-induced proliferation and angiogenesis of human retinal microvascular endothelial cells by the regulation of AKT and ERK pathways via maspin. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 82, n. 8, p. 1366–1376, 2018.

RALLA, B. et al. miR-9-5p in nephrectomy specimens is a potential predictor of primary resistance to first-line treatment with tyrosine kinase inhibitors in patients with metastatic renal cell carcinoma. **Cancers**, v. 10, n. 9, p. 321, 2018.

RAMACHANDRAN, D. et al. Sirt1 and miR-9 expression is regulated during glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-islets. **FEBS Journal**, v. 278, n. 7, p. 1167–1174, 2011.

RANA, S. et al. Nutrigenomics and its impact on lifestyle associated metabolic diseases. **Current Genomics**, v. 17, n. 3, p. 261, 2016.

RANGEL, É. B.; RODRIGUES, C. O.; DE SÁ, J. R. Micro- and macrovascular complications in diabetes mellitus: preclinical and clinical studies. **Journal of Diabetes Research**, v. 2019, 2019.

RAZAVI, L. N. et al. Five-year glycemic trajectories among healthy African-American and European-American offspring of parents with type 2 diabetes. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 359, n. 5, p. 266–270, 2020.

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

REN, C. et al. Physical activity and risk of diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis. **Acta Diabetologica**, v. 56, n. 8, p. 823–837, 2019.

REZAZADEH-GAVGANI, E. et al. MicroRNA-21: a critical underestimated molecule in diabetic retinopathy. **Gene**, v. 859, p. 147212, 2023.

RODRÍGUEZ, J. E.; CAMPBELL, K. M. Racial and ethnic disparities in prevalence and care of patients with type 2 diabetes. **Clinical Diabetes**, v. 35, n. 1, p. 66, 2017.

ROWLANDS, D. S. et al. Multi-omic integrated networks connect DNA methylation and miRNA with skeletal muscle plasticity to chronic exercise in Type 2 diabetic obesity. **Physiological genomics**, v. 46, n. 20, p. 747–765, 2014.

RUSSELL, N. D. F.; COOPER, M. E. 50 years forward: mechanisms of hyperglycaemia-driven diabetic complications. **Diabetologia**, v. 58, n. 8, p. 1708–1714, 2015.

SABOURI, E. et al. The role of microRNAs in the induction of pancreatic differentiation. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 16, n. 2, p. 145–154, 2020.

SALA-VILA, A. et al. Dietary marine ω -3 fatty acids and incident sight-threatening retinopathy in middle-aged and older individuals with type 2 diabetes: Prospective investigation from the PREDIMED trial. **JAMA Ophthalmology**, v. 134, n. 10, p. 1142–1149, 2016.

SALIMINEJAD, K. et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 5, p. 5451–5465, 2019.

SAMSU, Nur. Diabetic nephropathy: challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment. **BioMed research international**, v. 2021, n. 1, p. 1497449, 2021.

SANKAR, M. J.; SANKAR, J.; CHANDRA, P. Anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs for treatment of retinopathy of prematurity. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. John Wiley and Sons Ltd. 2018.

SANTOVITO, D. et al. Plasma microRNA signature associated with retinopathy in patients with type 2 diabetes. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 4136, 2021.

SECLAMAN, E. et al. MicroRNAs mediate liver transcriptome changes upon soy diet intervention in mice. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, n. 3, p. 2263–2267, 2019.

SCHULZE, M. B. et al. Food based dietary patterns and chronic disease prevention. **BMJ (Online)**, v. 361, p. 1–6, 2018.

SHAN, L. et al. Expression and mechanism of microRNA 195 in diabetic retinopathy. **Endocrine journal**, v. 69, n. 5, p. 529–537, 2022.

SHAFABAKHSH, R. et al. Role of histone modification and DNA methylation in signaling pathways involved in diabetic retinopathy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 6, p. 7839–7846, 2019.

SHAH, J. et al. Dietary intake and diabetic retinopathy: A systematic review of the literature. **Nutrients**, v. 14, n. 23, p. 1–26, 2022.

SHARMA, A. et al. Unraveling the role of genetics in the pathogenesis of diabetic retinopathy. **Eye (Basingstoke)**, v. 33, n. 4, p. 624–634, abr. 2019.

SHARP, G. C.; RELTON, C. L. Epigenetics and noncommunicable diseases. **Epigenomics**, v. 9, n. 6, p. 789–791, 2017.

SHE, C. et al. Association between dietary antioxidants and risk for diabetic retinopathy in a Chinese population. **Eye**, v. 35, n. 7, p. 1977–1984, out. 2020.

SHIFERAW, W. S. et al. Glycated hemoglobin A1C level and the risk of diabetic retinopathy in Africa: A systematic review and meta-analysis. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 14, n. 6, p. 1941–1949, 2020.

SIMO, R et al. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. **Current Diabetes Reviews**, v. 2, p. 71-98, 2006.

SINGH, H. V. et al. Prevalence of diabetic retinopathy in self-reported diabetics among various ethnic groups and associated risk factors in North-East India: A hospital-based study. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 69, n. 11, p. 3132, nov. 2021.

SMIT-MCBRIDE, Z.; MORSE, L. S. MicroRNA and diabetic retinopathy—biomarkers and novel therapeutics. **Annals of Translational Medicine**, v. 9, n. 15, p. 1280–1280, ago. 2021.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2012-2020. [s.l: s.n.] v. 9.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. Brazilian guidelines of hypertension - 2020. [s.l: s.n.] v. 116516–658 p.

SOLOMON, S. D. et al. Diabetic retinopathy: A position statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 40, n. 3, p. 412, mar. 2017.

STEEMBURGO, T.; DE AZEVEDO, M. J.; MARTÍNEZ, J. A. Gene-nutrient interaction and its association with obesity and diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 497–508, 2009.

SU, C. L. et al. Physical activity is associated with lower health care costs among Taiwanese individuals with diabetes mellitus. **Medicine (United States)**, v. 99, n. 14, p. 1–5, 2020.

SUN, H. et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 183, p. 109119, 2022a.

SUN, J. et al. Dose-response association of leisure time physical activity with mortality in adults with major chronic diseases. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, n. December, p. 1–11, 2022b.

SUN, L-F.; CHEN, X-J.; JIN, Z-B. Emerging roles of non-coding RNAs in retinal diseases: A review. **Clinical & experimental ophthalmology**, v. 48, n. 8, p. 1085-1101, 2020.

SZCZEPANEK, J.; SKORUPA, M.; TRETYN, A. MicroRNA as a potential therapeutic molecule in cancer. **Cells**, v. 11, n. 6, p. 1008, 2022.

TAHERI, M. et al. Non-coding RNAs and type 2 diabetes mellitus. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 129, n. 2, p. 526-535, 2023.

TAN, F. et al. Associated risk factors in the early stage of diabetic retinopathy. **Eye and Vision**, v. 6, n. 1, p. 1–10, dez. 2019.

TANG, W. et al. MicroRNA-29b-3p inhibits cell proliferation and angiogenesis by targeting VEGFA and PDGFB in retinal microvascular endothelial cells. **Molecular Vision**, v. 26, n. February, p. 64–75, 2020.

TANG, X.; SUN, C. The roles of MicroRNAs in neural regenerative medicine. **Experimental Neurology**, v. 332, p. 113394, 2020.

TAO, J. MiR-21 is overexpressed in response to high glucose and protects endothelial cells from apoptosis. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 121, n. 7, p. 425–430, 2013.

TAPEH, B. E. G. et al. Emerging molecular functions of microRNA-9: Cancer pathology and therapeutic implications. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 17, p. 2304–2314, 2021.

THOUNAOJAM, M. C. et al. MicroRNA-34a (miR-34a) mediates retinal endothelial cell premature senescence through mitochondrial dysfunction and loss of antioxidant activities. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, 2019.

TOI, P. L. et al. Preventive role of diet interventions and dietary factors in type 2 diabetes mellitus: An umbrella review. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 1–17, 2020.

TOMÉ-CARNEIRO, J. et al. One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. **Pharmacological research**, v. 72, p. 69-82, 2013.

TUCCI, P. The role of microRNAs in cancer: functions, biomarkers and therapeutics. **Cancers**, v. 14, n. 4, p. 872, 2022.

UUSITUPA, M. et al. Prevention of type 2 diabetes by lifestyle changes: a systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2611, 2019.

VAN ROEKEL, E. H. et al. Physical activity, television viewing time, and DNA methylation in peripheral blood. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 51, n. 3, p. 490-498, 2019.

VASU, S. et al. MicroRNA signatures as future biomarkers for diagnosis of diabetes states. **Cells**, 2019.

VOUNZOULAKI, E. et al. Progression to type 2 diabetes in women with a known history of gestational diabetes: systematic review and meta-analysis. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 369, 2020.

WALGRAVE, H. et al. The promise of microRNA-based therapies in Alzheimer's disease: challenges and perspectives. **Molecular neurodegeneration**, v. 16, p. 1-16, 2021.

WANG, J. et al. Vitreous and plasma VEGF levels as predictive factors in the progression of proliferative diabetic retinopathy after vitrectomy. **PloS One**, v. 9, n. 10, p. e110531, 2014.

- WANG, L. et al. Histone deacetylases and inhibitors in diabetes mellitus and its complications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 177, p. 117010–117010, 1 ago. 2024.
- WANG, W.; LO, A. C. Y. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1816, 2018.
- WANG, J. et al. MicroRNA-148a-3p alleviates high glucose-induced diabetic retinopathy by targeting TGFB2 and FGF2. **Acta Diabetologica**, v. 57, n. 12, p. 1435–1443, 2020.
- WANG, L.; LI, H. MiR-770-5p facilitates podocyte apoptosis and inflammation in diabetic nephropathy by targeting TIMP3. **Bioscience Reports**, v. 40, n. 4, 2020.
- WANG, L.; LIU, W. X.; HUANG, X. G. MicroRNA-199a-3p inhibits angiogenesis by targeting the VEGF/PI3K/AKT signalling pathway in an in vitro model of diabetic retinopathy. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 116, p. 104488, 2020.
- WANG, L. Q. et al. Epigenetic inactivation of miR-9 family microRNAs in chronic lymphocytic leukemia - Implications on constitutive activation of NFκB pathway. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2013.
- WANG, M. et al. Noncoding RNAs are promising therapeutic targets for diabetic retinopathy: An updated review (2017–2022). **Biomolecules**, v. 12, n. 12, 2022.
- WILKINSON, C. P. et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. **Ophthalmology**, v. 110, n. 9, p. 1677–1682, 2003.
- WONG, T. et al. Guidelines on diabetic eye care: The International Council of Ophthalmology recommendations for screening, follow-up, referral, and treatment based on resource settings. **Ophthalmology**, v. 125, n. 10, p. 1608–1622, 2018.
- WONG, M. Y. Z et al. Dietary intake and diabetic retinopathy: a systematic review. **PLoS One**, v. 13, n. 1, p. e0186582, 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. [s.l.: s.n.]
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Waist circumference and waist-hip ratio. Report of a WHO Expert Consultation. Geneva: **World Health Organization**, v. 2008, p. 8-11, 2008.
- WU, L. et al. Serum miR-9a and miR-133b, diagnostic markers for Parkinson's disease, are up-regulated after Levodopa treatment. **Acta Medica Mediterranea**, v. 36, p. 1857–1863, 2020.
- WU, C.-T.; MORRIS, James R. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1103-1105, 2001.
- WU, Y. et al. Inter-relations between dietary patterns and glycemic control-related biomarkers on risk of retinopathy in type 2 diabetes. **Nutrients**, v. 16, n. 14, p. 2274, 2024.
- XIAO, Q. et al. NFE2/miR-423-5p/TFF1 axis regulates high glucose-induced apoptosis in

retinal pigment epithelial cells. **BMC Molecular and Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2019.

XIAO, Y. et al. Diabetic nephropathy: serum miR-9 confers a poor prognosis and is associated with level changes of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 10, p. 1583-1590, 2017.
doi.org/10.1007/s10529-017-2390-6.

YADAV, M. et al. A systematic review of the neuroprotective effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) in diabetic retinopathy and diabetic macular edema: unraveling the molecular mechanisms and clinical implications. **Cureus**, v. 15, n. 12, p. e51351, 2023.
doi.org/10.7759/cureus.51351.

YAN, X. et al. Does daily dietary intake affect diabetic retinopathy progression? 10-year results from the 45 and Up Study. **British Journal of Ophthalmology**, v. 104, n. 12, p. 1774–1780, 2021.

YANG, Y. et al. MicroRNA-15b targets VEGF and inhibits angiogenesis in proliferative diabetic retinopathy. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 105, n. 11, p. 3404–3415, 2020.

YE, E. A.; STEINLE, J. J. miR-15b/16 protects primary human retinal microvascular endothelial cells against hyperglycemia-induced increases in tumor necrosis factor alpha and suppressor of cytokine signaling 3. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2015.

YU, S. et al. Vitamin D receptor methylation attenuates the association between physical activity and type 2 diabetes mellitus: A case-control study. **Journal of Diabetes**, v. 14, n. 2, p. 97–103, 2022.

ZAFAR, S. et al. Retinal neurodegeneration as an early manifestation of diabetic eye disease and potential neuroprotective therapies. **Current Diabetes Reports**, v. 19, n. 4, p. 1–13, 2019.

ZHENG, Y. et al. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 2, p. 88–98, 2018.

ZHANG, H. et al. Acetylation of AGO2 promotes cancer progression by increasing oncogenic miR-19b biogenesis. **Oncogene**, v. 38, n. 9, p. 1410–1431, 2019.

ZHANG, Y. et al. Blood flow MRI of the human retina/choroid during rest and isometric exercise. v. 53, n. 7, p. 1–5, 2012.

ZHANG, Z. et al. miR-139-5p promotes neovascularization in diabetic retinopathy by regulating the phosphatase and tensin homolog. **Archives of Pharmacal Research**, v. 44, n. 2, p. 205–218, 2021.

ZHAO, X. et al. The correlation between microRNAs and diabetic retinopathy. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. July, p. 1–11, 2022.

ZHONG, Y. et al. Non-coding RNAs and exosomal non-coding RNAs in diabetic retinopathy: A narrative review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.

259, p. 128182, 2024.

ZHU, W. et al. Association of obesity and risk of diabetic retinopathy in diabetes patients. **Medicine**, v. 97, n. 32, p. e11807, 2018.

ZHUANG, P.; MURALEEDHARAN, C. K.; XU, S. Intraocular delivery of miR-146 inhibits diabetes-induced retinal functional defects in diabetic rat model. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 58, n. 3, p. 1646-1655, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO 1

Título: MiR-9-3 hypermethylation is associated with stages of diabetic retinopathy

Revista: Journal of Diabetes & Metabolic Disorders

Qualis A4

Fator de Impacto: 2.800

Publicado em: 18/04/2024

Autorização editorial do periódico: Reproduzido com permissão da Springer Nature

DOI: <https://doi.org/10.1007/s40200-024-01411-9>

MiR-9-3 hypermethylation is associated with stages of diabetic retinopathy

Bruno Rafael Virginio de Sousa ¹, Alexandre Sérgio Silva ², Caroline Severo de Assis ¹, Tainá Gomes Diniz ¹, Marina Gonçalves Monteiro Viturino ³, Isabella Wanderley de Queiroga Evangelista ³, Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva ⁴, Tatjana de Souza Lima Keesen ⁴, Naila Francis Paulo de Oliveira ⁵, Darlene Camati Persuhn ⁶,

*

¹ Post-Graduate Program in Nutrition Science, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil;

² Department of Physical Education, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil;

³ Ophthalmology, Otolaryngology and Oral and Maxillofacial Surgery Unit, Lauro Wanderley University Hospital, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil;

⁴ Department of Biotechnology, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil;

⁵ Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil;

⁶ Department of Molecular Biology and Post-Graduation Program in Nutrition Science, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil.

* Corresponding author: Federal University of Paraíba, Campus I – Jardim Cidade Universitária, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil. ZIPCODE: 58051-900. E-mail: darlenecp@hotmail.com. ORCID: 0000-0001-5291-5454.

Acknowledgements

We would like to thank Lauro Wanderley University Hospital (HUWL), Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil in particular to the Ophthalmology, Otolaryngology and Oral and Maxillofacial Surgery Unit and Endocrinology Outpatient Clinic and all participants in the study for participation and the financial support institutions, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brasília, Brazil), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brasília, Brazil) and the State of Paraíba Research Support Foundation (FAPESQ, Paraíba, Brazil).

Abstract

Purpose To investigate the potential relation between methylation of miR-9-3 and stages of diabetic retinopathy (DR). Additionally, we explored whether miR-9-3 methylation impacts the serum levels of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).

Methods A cross-sectional study was conducted with 170 participants with type 2 diabetes, including a control group (n = 64) and a diabetes retinopathy group (n = 106), which was further divided into NPDR (n = 58) and PDR (n = 48) subgroups. Epidemiological, clinical, anthropometric, biochemical ELISA assay were analysed. DNA extracted from leukocytes was used to profile miR-9-3 methylation using PCR-MSP.

Results MiR-9-3 hypermethylated profile was higher in the DR group ($p < 0.001$) and PDR subgroup compared to DM2 control group ($p < 0.001$). The hypermethylated profile in the PDR subgroup was also higher compared to NPDR subgroup ($p < 0.001$). There was no difference between DM2 control and NPDR group ($p = 0.234$). Logistic regression showed that miR-9-3 hypermethylation increases the odds of presenting DR (OR: 2.826; $p = 0.002$) and PDR (OR: 5.472; $p < 0.001$). In addition, hypermethylation of miR-9-3 in the DR and NPDR subgroup was associated with higher serum VEGF-A levels ($p = 0.012$ and $p = 0.025$, respectively).

Conclusion The methylation profile of the miR-9-3 promoter increases the risk of developing PDR. Higher levels of VEGF-A are associated with miR-9-3 hypermethylated profile in patients in the DR and NPDR stages.

Keywords Diabetic retinopathy, Epigenetic, microRNAs, methylation, VEGF-A

Introduction

Diabetes Retinopathy (DR) is one of the most common microvascular complications in patients with Diabetes Type 2 (DM2) [1], leading to preventable blindness [2]. The primary risk factors associated with DR include the duration of diabetes [3], poor glycemic control [4], and hypertension [5]. This microvascular complication affects the retinal cells and is manifested in two clinical stages: Non-Proliferative Diabetic Retinopathy (NPDR) and severe Proliferative Diabetic Retinopathy (PDR) [6].

The literature indicates that not all patients with DM2 develop DR. When it does occur, it may exhibit a slower [7] or faster evolution [8] in scenarios that are not always explained by the control or lack of control of the main risk factors. Therefore, the identification of early risk factors is crucial for developing optimal preventive and therapeutic strategies in managing diabetes and its complications.

One of the current molecular approaches in DM2 research is the study of microRNAs (miRs), a class of non-coding RNAs consisting of approximately 22 nucleotides. They play a crucial role in the post-transcriptional regulation of gene expression by either reducing messenger RNA translation or promoting its degradation [9]. These miRs are essential elements in regulating a number of processes associated with diabetes and its chronic complications [10]. Specifically, in the study of DR, certain microRNA expression patterns have been linked to its diagnosis and progression [11].

MicroRNA-9 (miR-9) consists of three independent loci in the Deoxyribonucleic acid (DNA): miR-9-1 on chromosome 1, miR-9-2 on chromosome 5, and miR-9-3 on chromosome 15. Methylation in the promoter region of the miR-9 gene prevents the transcription of pri-miRs that give rise to mature miR-9, ultimately affecting its expression [12]. MiR-9 is expressed in insulin-secreting pancreatic β cells. Its increased levels significantly impact insulin secretion stimulated by elevated glucose levels in both in vitro and in vivo models by modulating granulophilin expression through the transcription factor ONECUT2 (OC2) [13].

MiR-9 targets the deacetylase Sirt1 [14], which, in turn, represses the expression of the gene encoding the mitochondrial uncoupling protein UCP2 [15]. This repression leads to an increase in glucose-stimulated insulin secretion [16]. Another regulatory pathway that affects insulin secretion is the Syntaxin binding protein 1 (Stxbp1), which is involved in the intracellular trafficking of vesicles [17]. In the islets of patients with DM2, the expression of Stxbp1 is decreased, resulting in reduced insulin secretion [18]. These molecules indirectly contribute to insulin secretion and their activity is influenced by glucose levels or the exposure of pancreatic secretory cells to glucose.

Studies have reported an association between a hypermethylated miR-9-3 promoter profile and an increased risk of DR in patients with DM2 [19-20]. Furthermore, elevated expression of miR-9 has been documented in newly diagnosed and long-term DM2 patients, as well as in patients with DM2 and coronary artery disease (CAD), [21-22]. However, this association has not been explored in the different stages of DR, and the underlying mechanisms explaining this association remain unclear.

One potential mechanistic pathway involves the positive regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), which plays a key role in the pathogenesis of DR [23]. VEGF promotes pathological neovascularization [24-25] and increases vascular permeability in the retina. The expression of VEGF is regulated by miR-9, suggesting an epigenetic control [26,27,28,29].

Given the previous evidence that associates the hypermethylation of miR-9-3 with DR, the relationship between miR-9-3 levels and control of insulin secretion and the already documented involvement in the regulation

of VEGF expression, the objective of this study was to analyze the potential relationship between miR-9-3 methylation and DR stages. We also explored whether VEGF levels differed in groups of diabetic patient samples with different miR-9-3 methylation profiles.

Methods

Participants, study design and Sample size

An epidemiological, cross-sectional study was conducted between October 1th, 2019 and July 30th, 2022 with 170 participants diagnosed with diabetes from the Endocrinology and Ophthalmology outpatient clinics of the University Hospital Lauro Wanderley University Hospital in the city of João Pessoa, state of Paraíba, Brazil. The study included patients of both sexes with DM2 who had been diagnosed for five years or more. Individuals with Type I Diabetes Mellitus (DM1), those diagnosed with DM2 for less than five years, those who underwent LASIK surgery, and those with insufficient DNA samples for methylation analysis were excluded. After medical diagnosis, participants were assigned to either a DM2 control group or to a DR group. In the morning, the participants went to the specialized laboratory for blood collection, for further biochemical analysis and DNA extraction from leukocytes. Then they went to the outpatient ophthalmology clinic for a funduscopy. On the same day, epidemiological data, clinical history and anthropometric data.

The required sample size was calculated using Raosoft Sample Size Calculator <http://www.raosoft.com/samplesize.html>. For calculating the sample size, the diabetic population in João Pessoa was considered. According to data from VIGITEL [30] the estimated number of diabetics in João Pessoa is approximately 72.552. To ensure a margin error of 5% and a confidence level of 95%, a sample size of 122 participants would be necessary. However, to account for potential sample losses, the sample was adjusted by 15%, resulting in a minimum of 140 participants needed for the study.

The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the University Hospital Lauro Wanderley of the Federal University of Paraíba (Opinion nº: 3.053.068 and 4.917.746) and was conducted in accordance with Resolution 466/2012 of the National Health Council. Written informed consent form was obtained prior to data collection.

Clinical characterization

Retinal evaluation was conducted using indirect binocular ophthalmoscopy, following pupillary dilation with 0.5% tropicamide. Retinal images of the macula and central disc were captured using a fundus camera. The diagnosis and classification of DR were determined based on the standards and recommendations of the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) [31] and Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) [32]. DR is been subdivided into two stages: NPDR and PDR. NPDR can be further categorized as mild, moderate, and severe, characterized by the presence of microaneurysms, exudates, retinal hemorrhages, and cotton wool spots. PDR is marked by neovascularization and vitreous hemorrhage. The control group (n = 64) consisted of patients with DM2 without retinopathy, while patients with DR (n = 106) were divided into subgroups: NPDR (n = 58) and PDR (n = 48).

Anthropometric assessment

Weight (kg) and height (m) were measured using an Omron Healthcare Brazil weight scales and a Sanny Standard portable stadiometer, respectively. The Body Mass Index (BMI) was calculated based on the measurements. Waist and hip circumferences were measured using an inextensible tape (Sanny Standard, São Paulo, Brazil).

Blood collection and biochemical analysis

After a 12-hour overnight fast, 20 mL of venous blood was collected and divided into tubes containing K3EDTA for DNA extraction and HbA1C measurement, as well a tube with clot activator to obtain serum for biochemical analysis. Blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes to obtain serum or plasma. Fasting glycemia (FG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), and triglycerides (TG) were measured using enzymatic methods, creatinine by the kinetic method, while glycated hemoglobin (HbA1c) was measured by the turbidimetric method. The analyses were carried out in an automatic analyzer (Selectra XL Flexor) using commercial control samples in accordance with the manufacturer's instructions (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, MG, Brazil). The concentration of low-density lipoprotein (LDL) was calculated using the Friedewald formula: $LDL = (total\ cholesterol) - (HDL) - (triglycerides \div 5)$ [33].

DNA isolation and miR-9-3 methylation

Leukocyte DNA was isolated using the GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) for later methylation analysis. A specific PCR method for methylation (PCR-MSP) was carried out, whose principle is to transform unmethylated cytosine into uracil through sodium bisulfite (EpiJET Bisulfite Conversion Kit - Thermo Fisher Scientific). As the method does not alter the structure of methylated cytosines, it is possible to detect the occurrence of methylation using sequence-specific primers [34]. Differences in the sequences after DNA treatment were detected by the PCR technique using Dream Taq™ Hot Start (Thermo Fisher Scientific) and specific primers for methylated and unmethylated sequences of miR-9-3 following specific PCR conditions described previously (19). After amplification, 7 µl of PCR products were subjected to electrophoresis performed on a 3% agarose gel with GelRed® (Biotium). DNA bands were visualized in translucent ultraviolet light. Methylated DNA and Unmethylated DNA controls were used (Cells-to-CpG™ Methylated & Unmethylated DNA Control Kit, Life Technologies) for both methylated and unmethylated amplification reaction conditions. The assay conditions were standardized at the point when the pair of primers designed for the methylated condition recognized the methylated control and no longer affected it; the opposite occurred for the pair of primers designed for the unmethylated condition, which was only able to recognize the unmethylated control DNA sample. The same amount of transformed DNA (100 ng) was tested with each pair of primers (methylated and unmethylated condition) independently. The result could be interpreted as a sample containing only methylated DNA when the sample only lit up in the methylated condition. It was considered partially methylated when both primers lit up and unmethylated when the band occurs only in this condition.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of VEGF-A

VEGF-A was analyzed by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methodology using a commercial kit (Human VEGF-A ELISA Kit RAB0507 Millipore, Saint Louis, USA), following the manufacturer's instructions. The serum samples and standards were incubated in a 96-well plate sensitized with anti-VEGF antibodies for 2.5 hours at room temperature. After being washed, the plates, were incubated for an additional hour with a biotinylated detection antibody. The plates were then treated with an avidin-peroxidase enzymatic complex (avidin-HRP) and. After 30 minutes, a substrate containing tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H₂O₂) was added. The reaction was stopped after 15 minutes with 1N phosphoric acid, and the reading was performed on a microplate reader at 450 nm. The VEGF-A assay's lower sensitivity was 10 pg/mL, and the standard curve's linear range was 8.23–6000 pg/mL. The concentration of VEGF-A was calculated using the standard curve.

Statistical analysis

The data were presented as mean, standard deviation (SD), or median with 95% confidence intervals for continuous variables, and absolute and relative frequency for categorical variables. The normality of continuous data was assessed using the Kolmogorov-Smirnov Test. To compare the groups, independent t-test or Mann-Whitney test (continuous variables) and a chi-square test or Fisher's exact test (categorical variables) were used. Age, Systolic Arterial Hypertension (SBP), Diastolic Blood Pressure (DBP), BMI, Waist-Hip Ratio (WHR), TC, and Low-density lipoprotein (LDL) were considered non-parametric variables, while DM2 Duration, Glucose, HbA1c, Creatinine, Triglycerides, and HDL were treated as parametric variables. Binary logistic regression was used to verify the odds ratio of methylation on DR. Models were chosen based on a hierarchical criterion, considering both the results of the statistical tests of group comparison and the clinical relevance of the variables to the main outcome (DR and PDR). The dependent variable was DR or PDR, and the independent variable was miR-9-3 hypermethylation. The adjustment/confusion variables were insulin treatment, male sex, TG, HDL, and creatinine. To analyse the influence of methylation on the stages of DR, another logistic regression model was used, with PDR as the dependent variable and miR-9-3 hypermethylation, insulin treatment, female gender, TG, HDL, and creatinine as independent variables. P values < 0.05 were considered statistically significant. Data were analysed using SPSS version 26 software (IBM SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

Table 1 presents the general characteristics of the participants. The DM2 control group had a higher absolute and relative frequency of female patients compared to the DR group ($p = 0.023$). Diabetes duration was longer in the DR group compared to the DM2 control group ($p < 0.001$). Insulin treatment was more frequent in DR patients compared to the DM2 control group ($p < 0.001$). SBP ($p < 0.001$), DBP ($p < 0.019$), and creatine ($p < 0.001$) were also higher in the DR group compared to the control group. In the subgroup analysis, the number of female patients was higher in the PDR subgroup compared to the DM2 control group ($p < 0.001$). The duration of DM2 was longer in both the NPDR and PDR subgroups than in the control group ($p < 0.001$ for both). Insulin treatment was more frequent in the NPDR and PDR subgroups compared to the DM2 control group ($p = 0.002$ and 0.033 , respectively).

208 Additionally, SBP levels were higher in the PDR compared to the DM2 control group ($p < 0.001$). No other
209 significant differences were observed.

210 **Table 1** Epidemiological, Clinical, Anthropometric, and Biochemical Characteristics of Study Participants (n = 170)

	DM2 control (n = 64)	DR (n = 106)	p value	NPDR (n = 58)	PDR (n = 48)	p value
<i>Epidemiological and clinical parameters</i>						
Age (years), mean ± SD	60.1 ± 11.3	60.9 ± 8.7	0.606	61.5 ± 9.7	60.2 ± 7.5	0.688
Sex, n (%)						
Female	46 (71.9)	57 (53.8)	0.019 ^a	37 (63.8)	20 (41.7)	0.339
Male	18 (28.1)	49 (46.2)		21 (36.2)	28 (58.3)	0.001 ^c
DM2 Duration (years), median and CI	8.5 (7.9-9.6)	17 (15.2-17.8)	0.001 ^a	15.5 (14.3-18)	18.5 (15.1-18.7)	0.001 ^b 0.001 ^c
Sedentary lifestyle, n (%)						
Yes	30 (46.9)	51 (48.1)	0.876	24 (41.4)	27 (56.3)	0.542
No	34 (53.1)	55 (51.9)		34 (58.6)	21 (43.7)	0.326
Tabagism n, (%)						
Yes	1 (1.6)	4 (3.8)	0.651	3 (5.2)	1 (2.1)	0.263
No	63 (98.4)	102 (96.2)		55 (94.8)	47 (97.9)	0.837
Alcoholism n, (%)						
Yes	3 (4.7)	8 (7.5)	0.463	4 (6.9)	4 (8.3)	0.600
No	61 (95.3)	98 (92.5)		54 (93.1)	44 (91.7)	0.430
Insulin treatment n, (%)						
Yes	27 (42.2)	71 (67)	0.002 ^a	41 (70.7)	30 (62.5)	0.002 ^b
No	37 (57.8)	35 (33)		17 (29.3)	18 (37.5)	0.033 ^c
SBP (mmHg), mean ± SD	131.8 ± 14.7	144.9 ± 21.5	0.001 ^a	143.4 ± 22.3	146.2 ± 20.6	< 0.001 ^{b, c}
DBP mmHg), mean ± SD	85 ± 7.7	89.2 ± 13.2	0.024 ^a	88.7 ± 14	89.5 ± 12.3	0.074
<i>Anthropometric parameters</i>						
BMI (kg/m ²), mean ± SD	30.1 ± 5	28.8 ± 4.5	0.086	29.2 ± 4.7	28.3 ± 4.3	0.144
WHR (cm), mean ± SD	0.96 ± 0.06	0.95 ± 0.05	0.834	0.95 ± 0	0.96 ± 0	0.742

<i>Biochemical parameters</i>						
Glucose (mg/dL), median and CI	130.5 (130.9-154.6)	132.5 (127-145.1)	0.468	135 (24.9-148.8)	129.5 (120.9-149.2)	0.767
HbA1c (mg/dL), median and CI	7.6 (7.5-8.2)	7.3 (7.2-7.7)	0.066	7.6 (7.3-8)	7.2 (7-7.6)	0.086
Creatinine (mg/dL), median and CI	0.73 (0.71-0.82)	0.88 (0.87-0.98)	0.001 ^a	0.87 (0.83-0.99)	0.90 (0.87-1.01)	0.001 ^{b, c}
Triglycerides (mg/dL), median and CI	129 (124.8-151.9)	113.5 (114.2-130.8)	0.056	116 (111.2-133.8)	110.5 (109.8-135.2)	0.161
Total cholesterol (mg/dL), mean $\pm$ SD	160.2 $\pm$ 35.9	164.2 $\pm$ 42.0	0.536	167.3 $\pm$ 46.2	160.4 $\pm$ 38.9	0.560
HDL (mg/dL), median and CI	38 (37.5-42.4)	42 (40-43.9)	0.149	42.5 (40.2-45.5)	40 (37.8-43.7)	0.233
LDL (mg/dL), mean $\pm$ SD	92.6 $\pm$ 35.5	98.5 $\pm$ 36.9	0.308	99.3 $\pm$ 40.1	97.5 $\pm$ 33	0.578

211 Data expressed as mean $\pm$ SD or median and (95% CI), n (%). In the DM2 control group versus RD group the data were analysed by independent t test or Mann-Whitney U test.
 212 In the DM2 control group versus NPDR versus PDR group the data were analysed by ANOVA one way or Kruskal-Wallis's test (continuous variables). The chi-square test was
 213 used to compare categorical the variables. Statistical significance: < 0.05. SAH: Systolic Arterial Hypertension, SBP: Systolic Blood Pressure, DBP: Diastolic Blood Pressure,
 214 BMI: Body Mass Index, WHR: Waist-Hip Ratio, HbA1c: Glycated hemoglobin, HDL: high-density lipoprotein cholesterol, LDL: low-density lipoprotein cholesterol.

215 ^a Significant statistical difference between DM2 control and DR;

216 ^b Significant statistical difference between DM2 control and NPDR subgroup;

217 ^c Significant statistical difference between DM2 control and PDR subgroup

Figure 1 illustrates the comparison of miR-9-3 promoter methylation profiles across clinical groups. The hypermethylated profile was more frequent in the DR group compared to the DM2 control group ($p < 0.001$; OR: 2.826; CI: 1.486-5.376). Furthermore, when stratified by retinopathy stage, the hypermethylated profile was significantly more frequent in the PDR subgroup (79.2% or 38 cases) compared to the DM2 control group (35.9% or 23 cases) ($p < 0.001$; OR: 6.774; CI: 2.856-16.067) and the NPDR subgroup (46.6% or 27 cases) ($p < 0.001$; OR: 4.363; CI: 1.834-10.381). There was no significant difference in the hypermethylated profile frequency, however, between the DM2 control and NPDR groups ($p = 0.234$).

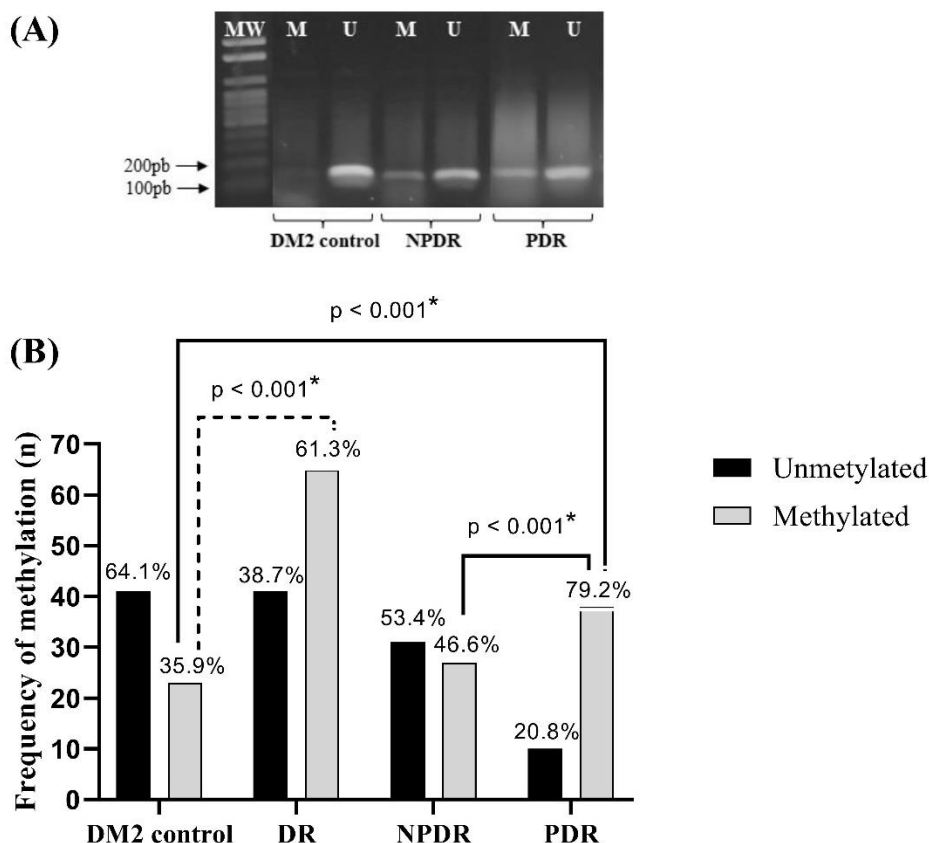


Fig. 1 miR-9-3 promoter methylation profile of participants. **A** Representative sample of the groups studied after MSP (116 bp); **B** Methylation frequency of DM2 control group, DR group, NPDR and PDR subgroups. MW: molecular weight, M: methylated, U: unmethylated, DR: Diabetes Retinopathy, NPDR: Non-Proliferative Diabetes Retinopathy, PDR: Proliferative Diabetes Retinopathy. Data analysed by Pearson's chi-square test. Data were represented as absolute and relative values. * < 0.05 : statistically significant difference

Table S1 (available as supplementary material) shows that in the DR group and the PDR subgroup, the frequency of female individuals was higher in hypermethylated patients compared to unmethylated ($p = 0.017$ and 0.041 , respectively). In the DM2 control group, the concentration of triglycerides was higher in hypermethylated patients compared to unmethylated ($p = 0.016$). Finally, in the PDR subgroup, the concentration of HDL was higher in unmethylated patients compared to hypermethylated ones ($p = 0.042$).

Table 2 shows the logistic regression analyses where DR was considered the dependent variable and miR-9-3 methylation profile was the independent variable. In all the models tested, miR-9-3 hypermethylation was identified as a risk factor for DR, regardless of the adjustment variables included. Additionally, models 2, 3 and 4

showed that insulin treatment was also a risk factor, while model 3 indicated that male gender was also a risk factor for developing DR.

Table 2 also shows logistic regressions where PDR was the dependent variable and the methylation pattern of miR-9-3 was as the independent variable. In all models tested, miR-9-3 hypermethylation was consistently identified as a risk factor for PDR, regardless of the inclusion of adjustment variables. Additionally, model 3 indicated that male gender was also a risk factor for developing PDR.

247 **Table 2** Logistic regression models verifying the influence of miR-9-3 methylation on DR and PDR.

Model 1				Model 2			Model 3			Model 4		
Predictor Variables	β (SE)	OR	IC 95%	β (SE)	OR	IC 95%	β (SE)	OR	IC 95%	β (SE)	OR	IC 95%
<i>Diabetes Retinopathy (dependent variable)</i>												
miR-9-3 methylation	1.039 ± 0.338	2.826	1.486-4.634	1.045 ± 0.338	2.845	1.465-5.522	0.879 ± 0.349	2.409	1.215-4.775	0.907 ± 0.367	2.476	1.206-5.084
Insulin treatment				1.029 ± 0.338	2.799	1.444-5.424	1.159 ± 0.351	3.186	1.601-6.338	1.015 ± 0.366	2.760	1.348-5.651
Male Sex							0.791 ± 0.375	2.207	1.059-4.599	0.439 ± 0.398	1.552	0.710-3.338
Triglycerides										0.007 ± 0.004	1.007	1.000-1.015
Creatinine										-1.891 ± 0.708	0.151	0.038-0.605
<i>Diabetes Proliferative Retinopathy (dependent variable)</i>												
miR-9-3 methylation	1.700 ± 0.400	5.472	2.497-11.991	1.692 ± 0.372	5.428	2.475-11.903	1.520 ± 0.410	4.573	2.048-10.208	1.497 ± 0.411	4.469	1.997-9.999
Insulin treatment				0.223 ± 0.372	1.249	0.603-2.588	0.353 ± 0.384	1.423	0.671-3.020	0.355 ± 0.388	1.426	0.667-3.053
Sex male							0.867 ± 0.379	2.380	1.133-4.997	0.799 ± 0.410	2.224	0.996-4.968
HDL										-0.005 ± 0.019	0.995	0.958-1.033
Creatinine										-0.752 ± 0.707	0.472	0.118-1.887

248 Variables tested by Binary Logistic Regression. Dependent variable: Diabetes Retinopathy or Diabetes Proliferative Retinopathy; Independent variable: miR-9-3 methylation B = beta regression coefficient ± standard error; OR = odds
249 ratio; CI 95%: upper and lower odds limits. * < 0.05: statistically significant difference.
250 **Models 1** no adjustment

Based on the previous evidence linking miR-9-3 hypermethylation to the occurrence and progression of DR (as shown in Figure 1, tables 2 and 3), we decided to investigate the possible association with the expression of VEGF-A. The analysis of VEGF-A showed that in the DR group and in the NPDR subgroup, patients with a hypermethylated profile had significantly higher VEGF levels compared to those with an unmethylated profile ($p < 0.005$). In the DM2 control group and PDR subgroup, there was no statistically significant difference in VEGF-A levels between hypermethylated and unmethylated profile groups. The results are presented in Figure 2, panels A and B.

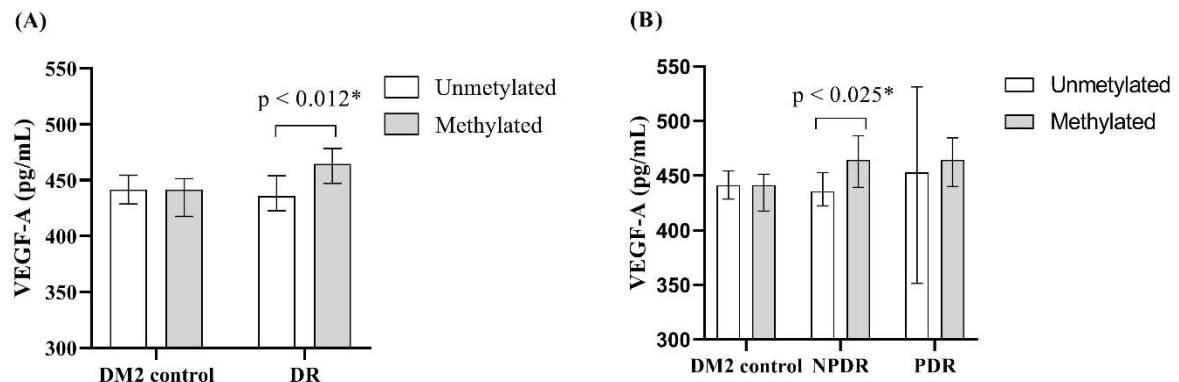


Fig. 2 Serum VEGF-A levels of participants according to miR-9-3 methylation ($n = 88$). **A** Serum VEGF-A levels in the occurrence of DR; **B** Serum VEGF-A levels in the progression of DR. Data analysed by Mann-Whitney U test. Data were represented as median and 95% CI. $* < 0.05$ = statistically significant difference. *DM2 control*: Diabetes mellitus control; *DR*: Diabetes Retinopathy

Discussion

This study provides evidence supporting the association between the hypermethylated profile of the miR-9-3 promoter and PDR. Furthermore, our findings suggest that this association may be mediated by alterations in serum VEGF levels. These findings support previous research indicating an association between miR-9-3 hypermethylation and DR at the same CpG sites [19-20]. Notably, our study distinguishes itself by demonstrating this association across different stages of DR, highlighting the effect associated with PDR samples and proposing an explanation for this relationship.

Our findings not only confirm the association between miR-9-3 hypermethylation and DR, but also highlight that this association is statistically confirmed in samples of PDR. Furthermore, our regression models demonstrated an association between male gender and both DR and PDR, which is consistent with previous research suggesting a male-associated predisposition in this microvascular complication of diabetes [35-36].

Previous data have shown elevated expression of miR-9 in patients newly diagnosed with DM2 compared to those without DM2 [21]. Similarly, when analyzing patients diagnosed with DM2 for approximately 15 years, the results were similar, indicating higher levels of miR-9 in patients with DM2 compared to non-diabetic and pre-diabetic controls [37]. Furthermore, increased plasma levels of miR-9 have also been identified in diabetes patients with CAD compared to patients with CAD without diabetes [22] thus, highlighting its promising role as a therapeutic target.

The results found in this work addressed the methylation profile miR-9-3 that impacts on the expression of the molecule [38]. A plausible mechanism that may explain the association between the hypermethylated profile

of miR-9-3 and the presence of DR and its stages found in this study, is that hypermethylation reduces miR-9-3 expression, which in turn deregulates the expression of the VEGF. Indeed, there is evidence from previous studies that different miRNAs can regulate VEGF expression in DR [39], including the miR-9 [29]. This factor regulates angiogenesis by inducing proliferation, migration and permeability of endothelial cells [24-25].

Our study confirms that miR-9-3 hypermethylation is associated with PDR and demonstrates for the first time the association to higher VEGF-A levels in DR and NPDR with miR-9-3 hypermethylated in humans samples. This is an observational cross-sectional study, which does not allow us to draw conclusions about associations that can only be demonstrated experimentally. However, the results reported here agree with experimental approaches. In a breast cancer cell model, mechanical compression induced downregulation of miR-9 via DNMT3A-dependent promoter methylation, leading to an increase in VEGF-A transcription [27]. This relationship was also tested in animal model of DR, where VEGF-A expression was higher in the retina of DR mice when miR-9 expression was lower [29]. Both results suggest the influence of miR-9 levels on VEGF expression and the involvement of an epigenetic control mechanism [26, 27, 28,29].

In humans, VEGF is a key player in the pathogenesis of DM2 micro-complications, with levels of VEGF accompanying the progression of diabetic nephropathy [26]. Moreover, elevated levels of VEGF have been observed in the vitreous and plasma of patients with severe DR [27]. This overexpression of VEGF is involved in key processes such as microaneurysm formation, increased permeability of the blood-retinal barrier (BRB), and stimulation of angiogenesis in advanced stages of DR [40].

Our study offers valuable insights into the potential application of miR-9-3 as an epigenetic marker and a future therapeutic target for DR. By establishing the detrimental association between miR-9-3 hypermethylation and serum VEGF levels in patients with DR and NPDR, we give support to the idea miR-9-3 expression may be able to regulate VEGF and affect the development of DR. Our findings highlight the importance of further investigating the role of miR-9-3 in the context of diabetes complication, exploring in detail the mechanisms involved and the factors associated with the expression of this miR. Therapeutic or behavioural strategies that control expression could benefit diabetic patients in preventing complications if the processes under study are consolidated.

Although our study provides valuable insights into the relationship between miR-9-3 hypermethylation and VEGF expression in DR and NPDR, it has some limitations. One of the main limitations is that we used a qualitative method for methylation determination, which may not provide accurate quantitative data. Additionally, due to the limited sample size for this analysis, findings regarding VEGF levels at different stages of DR, particularly in PDR, should be viewed with caution. Therefore, future studies with larger samples should investigate the relationship between miR-9-3 hypermethylation using quantitative methods and VEGF expression with larger samples at different stages of retinopathy to better elucidate these findings. We present here data from an observational cross-sectional study that needs to be better explored in experimental and longitudinal approaches. Therefore, extrapolating these findings to potential therapeutic applications represents a challenge and requires new experimental studies with different approaches.

Conclusion

The hypermethylation of the promoter of miR-9-3 poses a risk factor for PDR. Additionally, we observed an association between hypermethylated miR-9-3 and increased serum levels of VEGF-A in patients with DR and NPDR. These findings offer novel insights into the underlying molecular mechanisms involved in the progression of DR and emphasize the necessity for further exploration of the role of miR-9-3 in the development of this condition.

Authors' contributions The research project was conceptually developed by DCP, who also played a main role in securing funding, formulating the methodology, and overseeing project administration and supervision. BRVS conducted the formal analysis, led the investigation, and was primarily responsible for the original draft of the writing. The investigative team comprised BRVS, ASS, CSA, TGD, IWQE, MGMV, LHAC-S, TSLK, and NFPO. DCP further contributed to the methodology and supervised the overall process. The collaborative effort also involved BRVS and DCP in the joint tasks of reviewing and editing the manuscript.

Funding National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brasília, Brazil), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brasília, Brazil) and the State of Paraíba Research Support Foundation (FAPESQ, Paraíba, Brazil)

Data availability The original contributions presented in this study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Declarations

Ethics approval and consent to participate The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the University Hospital Lauro Wanderley of the Federal University of Paraíba (Opinion n°: 3.053.068 and 4.917.746) and was conducted in accordance with Resolution 466/2012 of the National Health Council. Written informed consent form was obtained prior to data collection.

Consent for publication All authors approved the final manuscript and consent for publication

Conflict of Interest The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Khalil H. Diabetes microvascular complications-A clinical update. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 2017;11:S133-S139. doi.org/10.1016/j.dsx.2016.12.022
2. Steinmetz JD, Bourne RRA, Briant PS, Flaxman SR, Taylor HRB, Jonas JB, et al. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to

- VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Glob Heal.* 2021;9(2):e144–60. doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30489-7
3. Ghamdi AH Al. Clinical Predictors of Diabetic Retinopathy Progression; A Systematic Review. *Curr Diabetes Rev.* 2020;16(3):242-247. doi.org/10.2174/1573399815666190215120435
4. Shiferaw WS, Akalu TY, Desta M, Kassie AM, Petrucka PM, Assefa HK, et al. Glycated hemoglobin A1C level and the risk of diabetic retinopathy in Africa: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 2020;14(6):1941–9. doi.org/10.1016/j.dsx.2020.10.003
5. Liu Y, Li J, Ma J, Tong N. The Threshold of the Severity of Diabetic Retinopathy below Which Intensive Glycemic Control Is Beneficial in Diabetic Patients: Estimation Using Data from Large Randomized Clinical Trials. *J Diabetes Res.* 2020;2020:1-6. doi.org/10.1155/2020/8765139
6. Wong TY, Cheung CMG, Larsen M, Sharma S, Simó R. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2(1):16012. doi.org/10.1038/nrdp.2016.12
7. Voigt M, Schmidt S, Lehmann T, Köhler B, Kloos C, Voigt U, et al. Prevalence and Progression Rate of Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes Patients in Correlation with the Duration of Diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2018 28;126(09):570–576. doi.org/10.1055/s-0043-120570
8. Gange WS, Lopez J, Xu BY, Lung K, Seabury SA, Toy BC. Incidence of Proliferative Diabetic Retinopathy and Other Neovascular Sequelae at 5 Years Following Diagnosis of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2021;44(11):2518-2526. doi.org/10.2337/dc21-0228
9. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics.* 2004;5(7):522–531. doi.org/10.1038/nrg1379
10. Kowluru RA, Mohammad G. Epigenetic modifications in diabetes. *Metabolism.* 2022;126:154920. doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154920
11. Smit-McBride Z, Nguyen AT, Yu AK, Modjtahedi SP, Hunter AA, Rashid S, et al. Unique molecular signatures of microRNAs in ocular fluids and plasma in diabetic retinopathy. *PLoS One.* 2020;15(7):e0235541. doi.org/10.1371/journal.pone.0235541
12. Hildebrandt MAT, Gu J, Lin J, Ye Y, Tan W, Tamboli P, et al. Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene.* 2010;29:5724–5728. doi:10.1038/onc.2010.305

13. 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. doi.org/10.1074/jbc.M601225200
14. Ramachandran D, Roy U, Garg S, Ghosh S, Pathak S, Kolthur-Seetharam U. Sirt1 and mir-9 expression is regulated during glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -islets. *FEBS J*. 2011;278(7):1167-1174. doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08042.x
15. Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, et al. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic β cells. *PLoS Biol*. 2006;4:210–220. doi:10.1371/journal.pbio.0040031
16. Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM, Bernal-Mizrachi E, Ford E, Cras-Méneur C, et al. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic β cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab*. 2005;2:105–117. doi:10.1016/j.cmet.2005.07.001
17. Hu D, Wang Y, Zhang H, Kong D. Identification of miR-9 as a negative factor of insulin secretion from beta cells. *J Physiol Biochem*. 2018;74(2):291-299. doi.org/10.1007/s13105-018-0615-3
18. Ostenson C-G, Gaisano H, Sheu L, Tibell A, Bartfai T. Impaired Gene and Protein Expression of Exocytotic Soluble N -Ethylmaleimide Attachment Protein Receptor Complex Proteins in Pancreatic Islets of Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes*. 2006;55:435–440. doi:10.2337/diabetes.55.02.06.db04-1575
19. Dos Santos Nunes MK, Silva AS, Evangelista IWQ, Filho JM, Gomes CNAP, do Nascimento RAF, et al. Analysis of the DNA methylation profiles of miR-9-3, miR-34a, and miR-137 promoters in patients with diabetic retinopathy and nephropathy. *J Diabetes Complications*. 2018;32(6):593–601. doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2018.03.013
20. De Assis CS, Silva AS, dos Santos Nunes MK, Filho JM, do Nascimento RAF, Gomes CNAP, et al. Methylation Profile of miR-9-1 and miR-9-1/-9-3 as Potential Biomarkers of Diabetic Retinopathy. *Curr Diabetes Rev*. 2021;17(6). doi.org/10.2174/1573399817666210101104326
21. 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):61–69. doi.org/10.1007/s00592-010-0226-0
22. Motawae TM, Ismail MF, Shabayek MI, Seleem MM. MicroRNAs 9 and 370 Association with Biochemical Markers in T2D and CAD Complication of T2D. Ray RB, ed. *PloS One*. 2015;10(5):e0126957. doi.org/10.1371/journal.pone.0126957

23. Wang J, Chen S, Jiang F, You C, Mao C, Yu J, et al. Vitreous and Plasma VEGF Levels as Predictive Factors in the Progression of Proliferative Diabetic Retinopathy after Vitrectomy. *PLoS One*. 2014;9(10):e110531. doi.org/10.1371/journal.pone.0110531
24. Zhang D, Lv FL, Wang GH. Effects of HIF-1 α on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22:5071–5076. doi:10.26355/eurev_201808_15699
25. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *Mech Angiogenes*. 2005;(94):209-231. doi.org/10.1007/3-7643-7311-3_15
26. Xiao Y, Guo S, Zhang Y, Bian Z, Jia L, Hu Y, et al. Diabetic nephropathy: serum miR-9 confers a poor prognosis in and is associated with level changes of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor. *Biotechnol Lett*. 2017;39(10):1583–1590. doi.org/10.1007/s10529-017-2390-6
27. Kim BG, Gao MQ, Kang S, Choi YP, Lee JH, Kim JE, et al. Mechanical compression induces VEGFA overexpression in breast cancer via DNMT3A-dependent miR-9 downregulation. *Cell Death Dis*. 2017;8(3):e2646–e2646. doi.org/10.1038/cddis.2017.73
28. Madelaine R, Sloan SA, Huber N, Notwell JH, Leung LC, Skariah G, et al. MicroRNA-9 Couples Brain Neurogenesis and Angiogenesis. *Cell Rep*. 2017;20:1533–1542. doi:10.1016/j.celrep.2017.07.051
29. Liu WL. MicroRNA-9 inhibits retinal neovascularization in rats with diabetic retinopathy by targeting vascular endothelial growth factor A. *J Cell Biochem*. 2019;120(5):8032-8043. doi.org/10.1002/jcb.28081
30. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. VIGITEL Brasil 2006-2021. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.
31. Chew EY, Ambrosius WT, Howard LT, Greven CM, Johnson S, Danis RP, et al. Rationale, Design, and Methods of the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Eye Study (ACCORD-EYE). *Am J Cardiol*. 2007;99(12 SUPPL.):S103–S111. doi.org/10.1016/j.amjcard.2007.03.028
32. Gangnon RE, Davis MD, Hubbard LD, Aiello LM, Chew EY, Ferris FL, et al. A Severity Scale for Diabetic Macular Edema Developed from ETDRS Data. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 1;49(11):5041–7. doi.org/10.1167/iovs.08-2231
33. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499-502. doi.org/10.1093/clinchem/18.6.499

- 448 34. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay
449 for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93(18):9821-9826.
450 doi.org/10.1073/pnas.93.18.9821
- 451 35. Al-Rubeaan K, Abu El-Asrar AM, Youssef AM, Subhani SN, Ahmad NA, Al-Sharqawi AH, et al. Diabetic
452 retinopathy and its risk factors in a society with a type 2 diabetes epidemic: a Saudi National Diabetes
453 Registry-based study. *Acta Ophthalmol.* 2015;93(2):e140–7. doi.org/10.1111/aos.12532
- 454 36. Nittala MG, Keane PA, Zhang K, Sadda SR. Risk Factors for Proliferative Diabetic Retinopathy in a Latino
455 American Population. *Retina.* 2014;34:1594. doi:10.1097/IAE.0000000000000117
- 456 37. Al-Muhtaresh HA, Al-Kafaji G. Evaluation of Two-Diabetes Related microRNAs Suitability as Earlier
457 Blood Biomarkers for Detecting Prediabetes and type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Me.* 2018;7:12.
458 doi:10.3390/jcm7020012
- 459 38. Heller G, Weinzierl M, Noll C, Babinsky V, Ziegler B, Altenberger C, et al. Genome-wide miRNA
460 expression profiling identifies miR-9-3 and miR-193a as targets for DNA methylation in non-small cell lung
461 cancers. *Clin Cancer Res.* 2012;18(6):1619–1629. doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2450
- 462 39. Gong Q, Su G. Roles of miRNAs and long noncoding RNAs in the progression of diabetic retinopathy. *Biosci*
463 *Rep.* 2017;37:1-18. doi:10.1042/BSR20171157
- 464 40. Simo R, Carrasco E, Garcia-Ramirez M, Hernandez C. Angiogenic and Antiangiogenic Factors in
465 Proliferative Diabetic Retinopathy. *Curr Diabetes Rev.* 2006;2:71-98. doi:10.2174/157339906775473671.

APÊNDICE B – ARTIGO 2**Título:** Physical activity levels influence miR-9-3 methylation in Diabetic Retinopathy**Revista:** Journal of Physical Activity & Health**Qualis** A2**Fator de Impacto:** 2.900

Physical activity levels influence *miR-9-3* methylation in Diabetic Retinopathy

Bruno Rafael Virginio de Sousa ¹, Caroline Severo de Assis ¹, Alexandre Sérgio Silva ² Tainá Gomes Diniz ¹, Eder Jackson de Almeida Filho ², Mylenne da Silva Barros ³; Marina Gonçalves Monteiro Viturino ⁴, Isabella Wanderley de Queiroga Evangelista ⁴, Darlene Camati Persuhn ¹, *

¹ Laboratory of Molecular Studies Applied to Clinical Practice, Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil;

² Laboratory for the Study of Physical Training Applied to Performance and Health, Department of Physical Education, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil;

³ Laboratory of Molecular Studies Applied to Clinical Practice, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil;

⁴ Laboratory of Molecular Studies Applied to Clinical Practice, Department of Molecular Biology; Ophthalmology, Otolaryngology and Oral Maxillofacial Surgery Unit, Lauro Wanderley University Hospital, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil.

* Corresponding author: Federal University of Paraíba, Campus I – Jardim Cidade Universitária, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil. ZIPCODE: 58051-900. E-mail: darlenecp@hotmail.com. ORCID: 0000-0001-5291-5454.

Abstract

Purpose To analyze the association between physical activity levels (PAL) and *miR-9-3* methylation in patients with Diabetic Retinopathy (DR).

Methods A cross-sectional study was carried out with 170 participants with type 2 diabetes, consisting of a control group (n = 64) and a group with diabetic retinopathy (n = 106). PAL was assessed using the IPAQ short version. DNA extracted from leukocytes was analyzed for *miR-9-3* methylation using PCR-MSP. In addition, plasma concentrations of Total Antioxidant Capacity (TAC), glycemia, glycated hemoglobin, creatinine, total cholesterol, HDL-C, and triglycerides were analyzed..

Results PAL classified as insufficient was shown to be a risk factor for *miR-9-3* methylation (OR = 2.592 CI = 1.308-5.137; p = 0.006), regardless of the adjustment variables. In addition, a higher concentration of TAC was found to be a protective variable against *mir-9-3* methylation (OR = 0.409; IC = 0.195-0858, p = 0.018).

Conclusion The low level of physical activity increases the chances of *miR-9-3* methylation by 2.4 times. This reaction is an epigenetic process that contributes to type 2 diabetes and, consequently, to DR. Furthermore, plasma antioxidant activity appears to offer a protective barrier against this epigenetic condition in patients with DR.

Keywords Physical Activity Levels, *miR-9-3* Methylation, Diabetic Retinopathy, Total Antioxidant Capacity.

Introduction

Diabetic retinopathy (DR) is a common microvascular complication that affects 30 to 40% of diabetic individuals. Alterations occur in the retinal vasculature, which generate a reduction in blood supply to the retina, damage to the retinal microenvironment, and retinal metabolic disturbance, thus impairing the structure and function of the retina and leading to loss of vision [2]. This complication occurs, to a large extent, in individuals who are still of reproductive age and the main risk factors are the time since diagnosis of Diabetes Type 2 (DM2) [3], glycemic control [4], and high blood pressure [5].

Despite the well-established risk factors, their impact on the development and severity of DR remains incompletely understood. Some patients with poor glycemic and blood pressure control do not develop DR, while others with effective management of these factors still progress to the disease. In fact, the "Diabetes Control and Complications Trial" demonstrated that glycemic control accounts for only about ~11% of the variation in DR risk, with the remaining risk attributed to other factors within the diabetic environment [6].

Therefore, the established risk factors may not be sufficient to explain DR. The risk factors for DR are largely the same as those for diabetes, such as inadequate glycemic control and hypertension [7]. However, the influence of factors such as physical inactivity [8] and oxidative stress [9], which are related to DM2, on DR is not yet well defined and requires further studies.

In addition to established risk factors, genetic and epigenetic factors are crucial in the diagnosis and progression of DR. Changes in DNA methylation, histone modification, and expression of non-coding RNAs, especially microRNAs (miRNAs), play an important role. Recent studies indicate that miRNAs, due to their high sensitivity and specificity, can serve as effective non-invasive biomarkers in the detection and progression of DR, influencing microvascularization, dyslipidemia, and disease slowdown [10-11].

MicroRNA-9 (*miR-9*) is located in three independent loci in DNA [12] and its expression is affected by methylation in the promoter region of the gene [13]. Increased *miR-9* in pancreatic β -cells influences insulin secretion by regulating granulophilin expression through the transcription factor ONECUT2 (OC2) [14] and modulating insulin secretion by inhibiting Sirt1 deacetylase, in addition to suppressing the expression of the mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) [15-16]. Furthermore, reduced expression of syntaxin-binding protein 1 [17] is associated with lower insulin secretion in patients with DM2 [18], highlighting the

importance of these mechanisms in regulating glycemic homeostasis and the physiology of pancreatic secretory cells, and consequently, in the pathogenesis of DR [15].

Recent findings reported a consistent association between the methylated profile of *miR-9-3* and an increased risk of developing DR in patients with DM2, which ranged between 7 and 8 times, respectively [19-20]. This methylation profile was found to be particularly linked to an approximately 2.5-fold increase in the odds ratio of developing proliferative diabetic retinopathy (PDR). Furthermore, higher levels of Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) are associated with this methylated profile in patients with non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) [21].

Based on these findings, the need to deepen understanding of the role of *miR-9-3* in DR and the mechanisms of its epigenetic control is evident. Factors such as oxidative stress [22] and physical activity [23] can induce alterations in the expression of microRNAs in DM2 and DR. Studies indicate that physical activity can alter the methylation of genes, such as Vitamin D Receptor (*VDR*) [24], Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) [25], and several miRNAs, in DM2 patients [26]. Furthermore, there is an association between oxidative stress, DNA methylation, insulin secretion [27] and the incidence of DM2 [28]. However, the role of physical activity and oxidative stress on *miR-9-3* methylation has not yet been investigated.

Therefore, we hypothesized that insufficient physical activity is a risk factor for *miR-9-3* methylation and, consequently, is involved in the development of DR. The objective of the current study was to verify the influence of physical activity level (PAL) on *miR-9-3* methylation in patients with DR.

Materials and Methods

Type of study, ethical aspects, and sample size

A cross-sectional epidemiological study was carried out from October 2019 to July 2022. This study involved 170 individuals diagnosed with type 2 diabetes and was carried out in the Endocrinology and Ophthalmology outpatient clinics of the Lauro Wanderley University Hospital in João Pessoa, Paraíba, Brazil. The study included men and women who had DM2, with at least five years since diagnosis. Participants were excluded if they had type 1 diabetes mellitus, DM2 diagnosed less than five years previously, a history of LASIK surgery, or those who presented insufficient DNA samples for methylation analysis. After receiving a medical diagnosis, participants were divided into two groups: the DM2 control group and the DR group.

The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Lauro Wanderley University Hospital of the Federal University of Paraíba (Opinion nos.: 3.053.068 and 4.917.746) and was conducted in accordance with Resolution 466/2012 of the National Council of Health. Participants signed the free and informed consent form before data collection.

The required sample size was calculated using the Raosoft Sample Size Calculator program, <http://www.raosoft.com/samplesize.html>. To calculate the sample size, the diabetic population of João Pessoa was considered. According to data from VIGITEL 2006-2021 [29], the estimated number of individuals with diabetes in João Pessoa is approximately 72.552. To guarantee a margin of error of 5% and a confidence level of 95%, a sample size of 122 participants was required. However, to account for possible sample losses, the sample was adjusted by 15%, resulting in a minimum of 140 participants needed for the study.

Clinical characterization

Retinal evaluation was performed using indirect binocular ophthalmoscopy, after pupillary dilation with 0.5% tropicamide. Retinal images of the macula and central disc were captured with a fundus camera. The diagnosis and classification of DR were determined based on the standards and recommendations of the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) [30] and the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) [31], with the examinations carried out by specialized ophthalmologists. The DM2 control group (n = 64) consisted of patients with DM2 without retinopathy, while patients with diabetic retinopathy constituted the DR group (n = 106).

Blood collection and biochemical analyses

In total, 20 mL of venous blood were collected after a 12-hour overnight fast. DNA extraction and glycated hemoglobin (HbA1C) measurements were performed in tubes containing K3EDTA, while blood collection for biochemical analysis was performed in a clot activator tube. Serum or plasma was separated during centrifugation for 15 minutes at 3000 rpm. Glycemia, total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and triglycerides (TG) were analyzed using enzymatic techniques. Creatinine and HbA1c were analyzed using kinetic and turbidimetric techniques, respectively. Commercial kits and an automatic analyzer (Selectra XL Flexor) were used according to the manufacturer's instructions.

The Friedewald formula was used to determine the concentration of low-density lipoproteins cholesterol (LDL-C): $LDL-C = (total\ cholesterol) - (HDL-C) - (triglycerides\ 5) [32]$.

The evaluation of antioxidant activity followed the procedure described by Brand-Williams, Cuvelier and Berset [33]. A solution of 1.25 mg of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was dissolved in 100 mL of 99.5% absolute ethanol. This DPPH solution was stored in a refrigerated environment protected from light. For the assay, 2 mL of diluted DPPH solution was mixed with 50 μ L of plasma in individual tubes. The mixture was vortexed and incubated for 30 minutes. Subsequently, the tubes were centrifuged at 10.000 g for 15 minutes at a temperature of 20°C. The resulting supernatant was used for spectrophotometric analysis at a wavelength of 515 nm using a Biospectro SP-22 spectrophotometer (Curitiba, Brazil). Antioxidant activity was expressed as a percentage, representing the difference between the concentrations of DPPH radicals remaining after 30 minutes in the sample (t) and in the blank (B). The blank, composed only of distilled water and DPPH, served as a control during spectrophotometric readings.

DNA isolation and *miR-9-3* methylation analyses

Leukocyte DNA was isolated using the GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) for subsequent methylation analysis. A methylation-specific PCR method (PCR-MSP) was carried out, which is used to transform unmethylated cytosine into uracil using sodium bisulfite (EpiJET Bisulfite Conversion Kit - Thermo Fisher Scientific). Since the method does not alter the structure of methylated cytosines, it is possible to detect the occurrence of methylation using sequence-specific primers [34]. Differences in sequences after DNA treatment were detected by the PCR technique using Dream Taq™ Hot Start (Thermo Fisher Scientific), and specific primers for the methylated and unmethylated sequences of *miR-9-3*, following specific PCR conditions, as previously described [19]. After amplification, 7 μ L of PCR products were subjected to electrophoresis performed on a 3% agarose gel with GelRed® (Biotium). DNA amplicons were visualized under translucent ultraviolet light. Methylated DNA and unmethylated DNA controls (Cells-to-CpG™ Methylated & Unmethylated DNA Control Kit, Life Technologies) were used for the methylated and unmethylated amplification reaction conditions. DNA amplicons were visualized under translucent ultraviolet light. Methylated DNA and unmethylated DNA controls (Cells-to-CpG™ Methylated & Unmethylated DNA Control Kit, Life Technologies) were used for the methylated and unmethylated amplification reaction conditions. Assay

conditions were standardized at the point at which the primer pair designed for the methylated condition recognized the methylated control and no longer affected it; the opposite occurred for the primer pair designed for the unmethylated condition, which was only able to recognize the unmethylated control DNA sample. The same amount of transformed DNA (100 ng) was tested with each pair of primers (methylated and unmethylated condition) independently. The result can be interpreted as a sample that contains only methylated DNA when the sample is detected only in the methylated condition, partially methylated when both primers are detected, and unmethylated when the band occurs only in this condition.

Level of physical activity

The PAL was analyzed using the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) short version [35], considering the activities of the last seven days. The questionnaire covers four parts: walking, moderate physical activity, vigorous physical activity, and sitting time. Participants indicated the estimated frequency and duration of walking, moderate activity, vigorous activity, and total daily time spent in a sitting position. The answers were based on the activities performed in the previous week and the questionnaire was administered by a qualified researcher. The total number of minutes per week spent on moderate and vigorous physical activity in its various domains was considered. Participants who performed at least 150 minutes of light or moderate physical activity per week or at least 75 minutes of intense physical activity per week were classified as active. Participants who engaged in less than 150 minutes of light or moderate physical activity per week or less than 75 minutes of intense physical activity per week were classified as insufficiently active. To be classified as very active, participants were required to practice at least 300 minutes of moderate physical activity per week or at least 150 minutes of intense physical activity per week [36].

Anthropometric analysis

Body mass (kg) and height (m) were measured using a scale (Omron Healthcare Brazil, São Paulo, Brazil) and a portable stadiometer (Sanny, Standard, São Paulo, Brazil). The BMI was then calculated and participants classified according to the presence of overweight and obesity, according to the cut-off points for adults; overweight, BMI = 25-29.9 kg/m² and obesity, BMI $\geq$ 30 kg/m², and for older adults; overweight, BMI = $\geq$ 27 kg/m² < 30 kg/m², proposed by the

World Health Organization [37]. In addition, waist and hip circumferences were measured with an inextensible tape (Sanny, Standard, São Paulo, Brazil).

Statistical analysis

Data are presented as mean, standard deviation (SD) or median with interquartile range (IQR) for continuous variables, and absolute and relative frequencies for categorical variables. The normality of continuous data was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. To compare the groups, the independent t-test or the Mann-Whitney test (continuous variables) and the chi-square test or Fisher's exact test (categorical variables) were used. Binary logistic regression was used to evaluate the odds ratio of PAL on *miR-9-3* methylation. The models were selected based, firstly, on a hierarchical criterion, considering the results of statistical comparison tests between groups ($p < 0.05$), and, secondly, on the clinical relevance of the variables for the main outcome (*miR-9-3* methylation). The dependent variable was *miR-9-3* methylation, and the independent variable was PAL. Furthermore, in the analysis, the collinearity assumptions were rigorously tested and respected (absence of perfect correlation, tolerable correlation between the independent variables). Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Data were analyzed using SPSS software version 26 (IBM SPSS, Chicago, IL, USA) and graphic figures were generated using GraphPad Prism software version 8 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA).

Results

Table 1 presents the general characteristics of the participants. The DM2 control group had a higher absolute and relative frequency of female patients compared to the DR group ($p = 0.017$). Diabetes duration was longer in the DR group compared to the DM2 control group ($p = 0.001$). Insulin treatment was more frequent in DR patients compared to the DM2 control group ($p = 0.001$). SBP ($p = 0.001$), DBP ($p = 0.019$), and creatinine ($p = 0.001$) were also higher in the DR group compared to the control group.

Table 1. General Characteristics of Study Participants (n = 170)

	DM2 control			DR		
	Unmethylated (n = 41)	Methylated (n = 23)	p	Unmethylated (n = 41)	Methylated (n = 65)	p
Age (years)	60.1 ± 12	60.3 ± 10.2	0.945	60.2 ± 8.7	61.4 ± 8.8	0.468
Sex, n (%)						
Female	32 (78)	14 (60.9)	0.142	28 (68.3)	29 (44.6)	0.017*
DM2 duration (years)	8 (5)	9 (5)	0.220	15 (10)	17 (9)	0.506
Insulin treat, n (%)						
Yes	17 (41.5)	10 (43.5)	0.876	28 (68.3)	43 (66.2)	0.820
SBP (mmHg)	130 (20)	130 (20)	0.740	150 (40)	150 (30)	0.779
DBP mmHg)	80 (10)	80 (10)	0.823	90 (20)	90 (20)	0.717
BMI (kg/m ²)	30.5 ± 5.5	29.5 ± 3.7	0.428	28.5 ± 4.9	29 ± 4.3	0.609
WHR (cm)	0.96 ± 0.07	0.95 ± 0.05	0.476	0.94 ± 0.04	0.96 ± 0.05	0.072
Glycemia (mg/dL)	136 (67)	127 (39.5)	0.463	134 (72)	132 (58)	0.753
HbA1c (%)	7.8 (2.1)	7.2 (1.3)	0.114	7.4 (1.4)	7.2 (1.5)	0.267
Creatinine (mg/dL)	0.68 (0.35)	0.80 (0.23)	0.218	0.81 (0.40)	0.93 (4.45)	0.115
Triglycerides (mg/dL)	116 (79)	155 (46.5)	0.016*	115 (42)	110 (64)	0.536
TC (mg/dL)	161.8 ± 35.3	157.4 ± 37.5	0.642	171.4 ± 40	159.6 ± 43	0.239
HDL-c (mg/dL)	38 (12)	38 (14.5)	0.547	45 (16)	40 (14)	0.167
LDL-c (mg/dL)	96.9 ± 34.3	84.9 ± 37	0.191	103 ± 37	95.8 ± 36.8	0.235

Data expressed as mean ± SD or median and (IQR), n (%). In the DM2 control group versus DR group the data were analyzed by independent t test or Mann-Whitney U test. The chi-square test was used to compare categorical variables. Statistical significance = < 0.05. SAH = Systolic Arterial Hypertension; SBP = Systolic Blood Pressure; DBP = Diastolic Blood Pressure; PAL = Physical Activity Level; BMI = BodyMass Index; WHR: Waist-Hip Ratio; HbA1c: Glycated hemoglobin; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c: low-density lipoprotein cholesterol.

A Fig.1 presents an example of the analysis of the methylation profile of *miR-9-3*. Comparisons between the methylation profiles of *miR-9-3* in the two clinical groups showed that methylation was more frequent in the group with DR (n = 65; 61.3%) than in the DM2 control group (n = 23; 35.9%). This difference was statistically significant (p = 0.001).

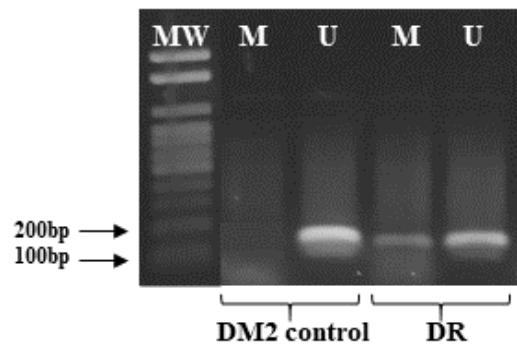


Fig 1 *miR-9-3* promoter methylation profile with representative samples of the groups studied after MSP (116 bp); *MW*: molecular weight; *M*: methylated; *U*: unmethylated. *DR*: Diabetes Retinopathy. Data analysed by Pearson's chi-square test. Data were represented as absolute and relative values. * < 0.05 = statistically significant difference.

A Fig. 2 presents the results regarding PAL according to the methylation profile of *miR-9-3*. In the DR group (Panel B), when comparing the methylation profile of *miR-9-3* with PAL, an imbalance was observed of the methylated and unmethylated states between those classified as active and insufficiently active, although without statistical difference. In the DM2 control group (Panel A), among insufficiently active patients, there was a significant imbalance in the distribution of methylation profiles. The frequency of patients with a methylated profile was higher compared to the unmethylated profile ($p = 0.011$). Among physically active patients, the frequency of unmethylated profiles was higher than methylated profiles. Furthermore, Panel C shows that, in the DM2 control group, patients with an unmethylated profile had a greater total time of physical activity in METs compared to methylated patients ($p = 0.010$).

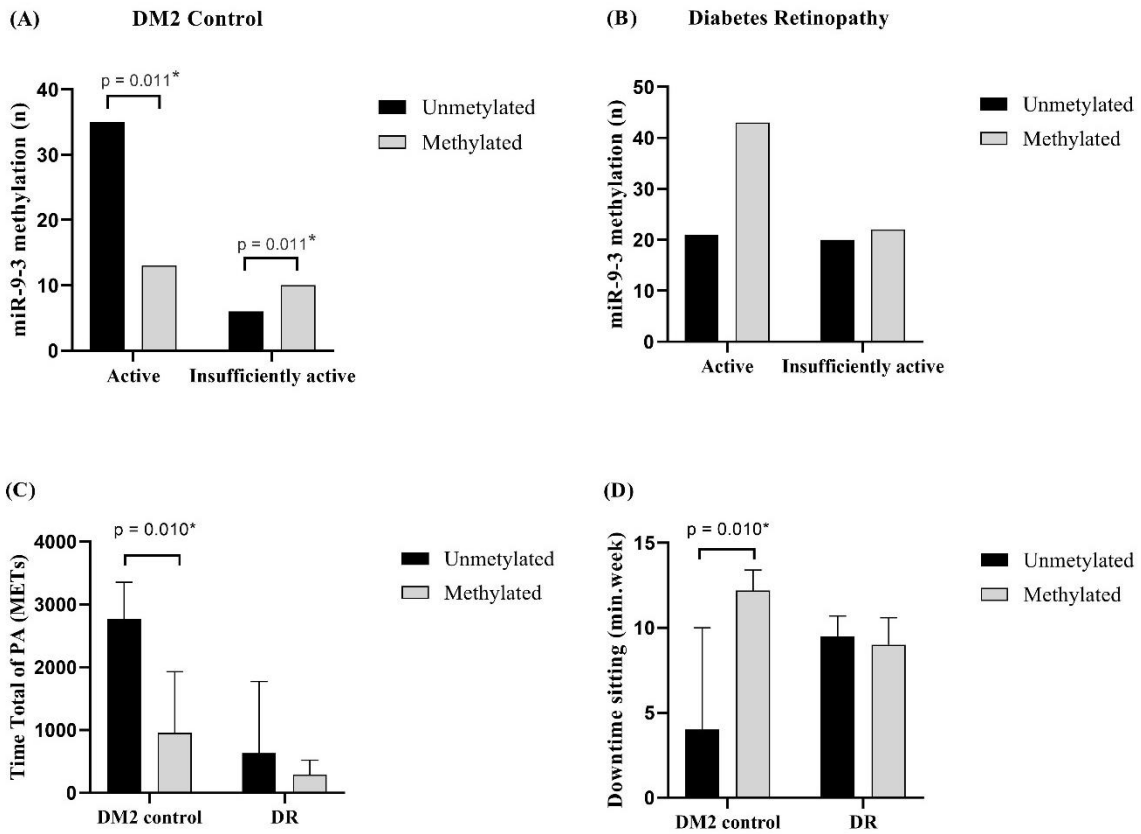


Fig. 2 Physical Activity Levels according to Methylation profile of *miR-9-3*. Data expressed as median and IQR, n (%). In the DM2 control group versus DR group the data were analysed by Mann-Whitney U test. The chi-square test was used to compare categorical variables. Statistical significance = < 0.05. PA = Physical Activity; METs = Metabolic Equivalent of Task.

The fig. 3 in the DR group, the TAC concentration was statistically higher in patients with an unmethylated *miR-9-3* profile (p = 0.013) compared to patients with a methylated profile, while no difference in TAC concentration was observed in the DM2 control group.

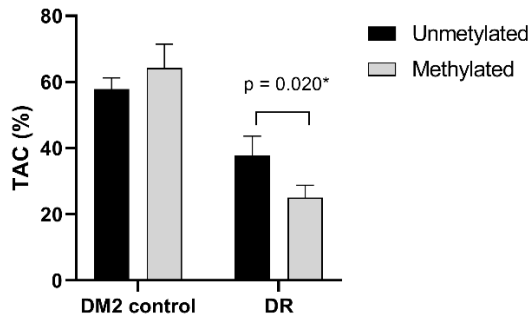


Fig. 3 Plasma antioxidant activity according to the methylation profile. Data expressed as median and interquartile IQR, n (%). In the DM2 control group versus DR group the data were analysed by Mann-Whitney U test. Statistical significance = < 0.05. TAC = Total Antioxidant Capacity

Table 2 presents the logistic regression analyses, in which the *miR-9-3* methylation profile was considered as the dependent variable and the PAL as the independent variable. In all models tested, PAL was identified as a risk factor for the methylated profile of *miR-9-3*, regardless of

555 TAC, sex, triglycerides, duration of DM2, and insulin therapy ($p = 0.000, 0.003, 0.003,$ and
556 0.006 , respectively). In addition, the TAC concentration was shown to be a protective covariate
557 against *miR-9-3* methylation in models 2, 3, and 4 ($p = 0.003, 0.018,$ and 0.021 , respectively).
558 The male sex was also an influencing covariate in *miR-9-3* methylation in models 3 and 4 ($p =$
559 0.017 and 0.014 , respectively).

Table 2. Logistic regression models verifying the influence of Physical Activity Level on *miR-9-3* methylation

	Model 1			Model 2			Model 3			Model 4		
Predictor Variables	β (SE)	OR	IC 95%	β (SE)	OR	IC 95%	β (SE)	OR	IC 95%	β (SE)	OR	IC 95%
Insufficiently PAL	1.216 $\pm$ 0.321	3.375*	1.797-6.337	1.001 $\pm$ 0.335	2.720*	1.412-6.243	1.118 $\pm$ 0.342	2.768*	1.416-5.411	0.953 $\pm$ 0.349	2.592*	1.308-5.137
active (%)												
TAC (%)				-1.041 $\pm$ 0.355	0.353*	0.176-0.709	-0.851 $\pm$ 0.368	0.427*	0.208-0.878	-0.894 $\pm$ 0.738	0.409	0.195-0858
Male Sex (%)							0.846 $\pm$ 0.353	2.331*	1.166-4.659	0.902 $\pm$ 0.368	2.465	1.198-5.072
Triglycerides (mg/dl)										-0.007 $\pm$ 0.004	0.993	0.986-1.001
DM2 duration (%)										-0.404 $\pm$ 0.374	0.667	0.321-1.389
Insulin therapy (%)										-0.159 $\pm$ 0.373	0.853	0.411-1.770

Variables tested by Binary Logistic Regression. Dependent variable: *miR-9-3* methylation; Independent variable: Physical Activity Level insufficiently active; B = beta regression coefficient $\pm$ standard error; OR = odds ratio; CI 95% = upper and lower odds limits; TAC = Total Antioxidant Capacity; * < 0.05 = statistically significant difference.
Models 1: no adjustment

Discussion

MiR-9-3 has been explored as a risk factor in the context of DM2, especially in DR. Dos Santos Nunes et al. [19] investigated the relationship between *miR-9-3* methylation and diabetic complications in patients with DM2, establishing an association between the methylation of this microRNA and the presence of DR. In a study conducted by De Assis et al. [20], *miR-9-3* methylation was also related to the presence of DR, in a more pronounced way. In a more recent study, carried out by Sousa et al. [21], the authors confirmed that methylation of *miR-9-3* increases the risk of developing DR, especially the PDR stage, and is associated with higher levels of plasma VEGF-A in patients with NPDR. These findings highlight the potential of *miR-9-3* as a promising biomarker for DR and its respective stages in patients with DM2.

This evidence aroused interest in investigating possible factors associated with the identified *miR-9-3* methylation patterns, since it is a molecular factor that has the potential to be reversed. In the present study, we identified an association between PAL and the methylation profile of *miR-9-3* in patients with DM2 without DR, as well as an association between plasma TAC concentration and the methylation profile of *miR-9-3* in patients with DR. Logistic regression analyses indicated that insufficient PAL is a risk factor for *miR-9-3* methylation, even after adjustments for variables such as TAC, sex, triglycerides, diabetes duration, and insulin therapy.

These findings suggest that encouraging adequate physical activity may be an effective strategy for preventing or delaying the development of DR in patients with DM2, offering a promising approach to managing the disease. Therefore, modifiable factors, such as the practice of physical activity, are known to be one of the main regulators of epigenetic markers [38]. In fact, the literature is consistent in reporting that physical activity is related to a lower risk of both DM2 [39-40] and DR [41-42].

The results presented here are in line with the findings of Diniz et al. [25], who identified an association between insufficient PAL and *MTHFR* gene methylation in patients with DM2. It is important to highlight that, while the study by Diniz et al. investigated the relationship between physical activity and the *MTHFR* gene, the present study investigated the association between physical activity and *miR-9-3*. Despite the differences in the genes studied, it is interesting to note that both studies used the IPAQ to assess physical activity and found associations in similar populations of diabetic patients. This consistency strengthens the validity of the results, especially considering that the studies were conducted in comparable population groups and in the same geographic region.

In a cohort developed in Australia with cancer patients, total physical activity, as measured by the IPAQ, was found to be associated with DNA methylation in peripheral blood at a specific CpG site in the serum amyloid A protein gene (*SAA2*). Weaker evidence was found of associations for other CpG sites with total physical activity, leisure-time physical activity, and time watching television, in an Australian population [43]. Furthermore, a study carried out with Polynesian individuals showed that physical training, both aerobic and resistance, conducted over 16 weeks in middle-aged obese individuals with DM2, resulted in hypomethylation of the GLUT-4 promoter, in addition to changes in *miR-29a* expression [44]. These findings complement studies that highlight the influence of DNA methylation patterns as indicators of a healthy lifestyle [45-46].

Insufficient PAL are associated with an increase in oxidative stress in the body [47-48]. Oxidative stress can trigger alterations in epigenetic processes, including the methylation of microRNAs [49], such as *miR-9-3*. Methylation of this *miR* can influence its expression, leading to altered regulation of target genes, including in the case of *mir-9-3* in VEGF production. Inhibited expression of *miR-9-3* results in an increase in the production of VEGF [50], which in turn is a crucial protein involved in angiogenesis and in the response to tissue injury. High levels of this factor are associated with DR [21]. Therefore, the relationship between low physical activity, oxidative stress, *miR-9-3* methylation, and increased VEGF production may represent a potentially important mechanism in the pathophysiology of DR.

Due to the nature of cross-sectional studies, it was not possible to establish cause and effect relationships here, but rather associations. This limitation prevents us from determining the temporal sequence of the variables studied; whether methylation occurred before the low total antioxidant capacity, or physical activity influenced the low total antioxidant activity, or perhaps a combination of both. Temporal nuances cannot be elucidated in this type of study. However, even considering these limitations, the current study paves the way for future interventional or longitudinal approaches, which could provide clearer and more definitive answers to these questions.

Conclusion

The results obtained in this study allow us to identify an association between insufficient PAL and *miR-9-3* methylation in DM2 patients. Additionally, a positive influence of TAC concentration on the methylation profile of *miR-9-3* in patients with DR stands out. These

findings suggest that physical activity plays an important role in epigenetic regulation and the development of DM2, which can lead to DR.

Acknowledgements

We would like to thank Lauro Wanderley University Hospital (HUWL), Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil in particular to the Ophthalmology, Otolaryngology and Oral and Maxillofacial Surgery Unit and Endocrinology Outpatient Clinic and all participants in the study for participation and the financial support institutions, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brasília, Brazil), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brasília, Brazil) and the State of Paraíba Research Support Foundation (FAPESQ, Paraíba, Brazil).

References

1. Khalil H. Diabetes microvascular complications-A clinical update. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 2017;11:S133–S139. doi.org/10.1016/j.dsx.2016.12.022.
2. McLaughlin T., Siddiqi M, Wang JJ, Zhang SX. Loss of XBP1 leads to early-onset retinal neurodegeneration in a mouse model of type I diabetes. *J. Clin. Med.* 2019;8:906. doi.org/10.3390/jcm8060906.
3. Ghamdi AH, Al. Clinical Predictors of Diabetic Retinopathy Progression; A Systematic Review. *Curr. Diabetes Rev.* 2020;16:242–247. doi.org/10.2174/1573399815666190215120435.
4. Shiferaw WS, Akalu TY, Desta M, Kassie AM, Petrucka PM, Assefa HK, et al. Glycated hemoglobin A1C level and the risk of diabetic retinopathy in Africa: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 2020;14(6):1941–9. doi.org/10.1016/j.dsx.2020.10.003.
5. Zhang M, Wu J, Wang Y, Wu J, Hu W, Jia H, et al. Associations between blood pressure levels and diabetic retinopathy in patients with diabetes mellitus: A population-based study. *Heliyon.* 2023;9:e16830. doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16830.
6. Lachin JM, Genuth S, Nathan DM, Zinman B, Rutledge BN. Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the diabetes control and complications trial-revisited. *Diabetes.* 2008;57:995–1001. doi.org/10.2337/db07-1618.
7. Ismail L, Materwala H, Al Kaabi J. Association of risk factors with type 2 diabetes: A systematic review. *Comput Struct Biotechnol J.* 2021;19:1759–1785. doi.org/10.1016/j.csbj.2021.03.003.
8. Silva DAS, Naghavi M, Duncan BB, Schmidt MI, De Souza MDFM, Malta DC. Physical inactivity as risk factor for mortality by diabetes mellitus in Brazil in 1990, 2006, and 2016. *Diabetol Metab Syndr.* 2019;11:1–11. doi.org/10.1186/s13098-019-0419-9.
9. Caturano A, D'Angelo M, Mormone A, Russo V, Mollica MP. et al. Oxidative Stress in Type 2 Diabetes: Impacts from Pathogenesis to Lifestyle Modifications. *Curr Issues Mol Biol.* 2023;45:6651–6666. doi.org/10.3390/cimb45080420.
10. Ma L, Wen Y, Li Z, Wu N, Wang Q. Circulating MicroRNAs as Potential Diagnostic Biomarkers for Diabetic Retinopathy: A Meta-Analysis. *Front Endocrinol.* 2022;13:1–13. doi.org/10.3389/fendo.2022.929924

11. Smit-McBride Z, Nguyen AT, Yu AK, Modjtahedi SP, Hunter AA, Rashid S, et al. Unique molecular signatures of microRNAs in ocular fluids and plasma in diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2020;15(7):e0235541. doi.org/10.1371/journal.pone.0235541.
12. Roese-Koerner B, Stappert L, Berger T, Braun NC, Veltel M, Jungverdorben J, et al. Reciprocal Regulation between Bifunctional miR-9/9* and its Transcriptional Modulator Notch in Human Neural Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Stem Cell Reports*. 2016;7(2):207–219. doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.06.008.
13. Hildebrandt MAT, Gu J, Lin J, Ye Y, Tan W, Tamboli P, et al. Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2010;29:5724–5728. [doi:10.1038/onc.2010.305](https://doi.org/10.1038/onc.2010.305).
14. 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. doi.org/10.1074/jbc.M601225200.
15. Ramachandran D, Roy U, Garg S, Ghosh S, Pathak S, Kolthur-Seetharam U. Sirt1 and mir-9 expression is regulated during glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -islets. *FEBS J*. 2011;278(7):1167–1174. doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08042.x.
16. Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, et al. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic β cells. *PLoS Biol*. 2006;4:210–220. [doi:10.1371/journal.pbio.0040031](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040031)
17. Hu D, Wang Y, Zhang H, Kong D. Identification of miR-9 as a negative factor of insulin secretion from beta cells. *J Physiol Biochem*. 2018;74(2):291–299. doi.org/10.1007/s13105-018-0615-3.
18. Ostenson C-G, Gaisano H, Sheu L, Tibell A, Bartfai T. Impaired Gene and Protein Expression of Exocytotic Soluble N -Ethylmaleimide Attachment Protein Receptor Complex Proteins in Pancreatic Islets of Type 2 Diabetic Patients *Diabetes*. 2006;55:435–440. [doi:10.2337/diabetes.55.02.06.db04-1575](https://doi.org/10.2337/diabetes.55.02.06.db04-1575).
19. Dos Santos Nunes MK, Silva AS, Evangelista IWQ, Filho JM, Gomes CNAP, do Nascimento RAF, et al. Analysis of the DNA methylation profiles of miR-9-3, miR-34a, and miR-137 promoters in patients with diabetic retinopathy and nephropathy. *J Diabetes Complications*. 2018;32(6):593–601. doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2018.03.013.
20. De Assis CS, Silva AS, dos Santos Nunes MK, Filho JM, do Nascimento RAF, Gomes CNAP, et al. Methylation Profile of miR-9-1 and miR-9-1/-9-3 as Potential Biomarkers of Diabetic Retinopathy. *Curr Diabetes Rev*. 2021;17(6). doi.org/10.2174/157339981766621011104326.
21. Sousa BRV, Silva AS, De Assis CS, Diniz TG, Viturino MGM, Evangelista IWQ, et al. MiR-9-3 hypermethylation is associated with stages of diabetic retinopathy. *J Diabetes Metab Disord*. 2023;23:1189–1198. doi.org/10.1007/s40200-024-01411-9.
22. Satari M, Aghadavod E, Mobini M, Asemi Z. Association between miRNAs expression and signaling pathways of oxidative stress in diabetic retinopathy. *J Cell Physiol*. 2018;234(6), 8522–8532. doi.org/10.1002/jcp.27801.
23. Liu X, Qian X, Tu R, Mao Z, Huo W, Zhang H, et al. SOCS3 methylation mediated the effect of sedentary time on type 2 diabetes mellitus: The Henan Rural Cohort study *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2020;30(4):634–643. doi.org/10.1016/j.numecd.2019.11.007.
24. Yu S, Feng Y, Qu C, Yu F, Mao Z. Vitamin D receptor methylation attenuates the association between physical activity and type 2 diabetes mellitus: A case-control study. *J Diabetes*. 2021;14(2):97–103. doi.org/10.1111/1753-0407.13239.
25. Diniz TG, Silva AS., dos Santos Nunes MK, Ribeiro MD, Filho JM, et al. Physical Activity Level Influences MTHFR Gene Methylation Profile in Diabetic Patients. *Front Physiol*. 2021;11:618672. doi.org/10.3389/fphys.2020.618672/BIBTEX.

26. Improtá-Caria AC, de Sousa RAL, Roever L, Fernandes T, de Oliveira EM, Júnior RA, et al. MicroRNAs in type 2 diabetes mellitus: potential role of physical exercise. *Rev Cardiovasc Med*. 2022;23(1):29. doi.org/10.31083/j.rcm2301029.
27. Zhou Y, Chen N, Li D, SunZhou, W, Zhou S. Excess Nicotinamide Induces Reactive Oxygen Species Generation, Insulin Resistance, and Epigenetic Change in Rats and Humans. *Behav Med Clin Nutr Educ Exerc*. 2018;67(1):783. doi.org/10.2337/db18-783-P.
28. Hedman ÅK, Zilmer M, Sundström J, Lind L, Ingelsson E. DNA methylation patterns associated with oxidative stress in an ageing population. *BMC Med Genomics*. 2016;72(9):1–12. doi.org/10.1186/s12920-016-0235-0.
29. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria De Vigilância em Saúde., 2022. No Title [WWW Document]. VIGITEL Bras. 2006–2021. Vigilância fatores risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigitel/vigitel-brasil-2006-2021/view> (accessed 13 March 2024).
30. Chew EY, Ambrosius WT, Howard LT, Greven CM, Johnson S, Danis RP, et al. Rationale, Design, and Methods of the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Eye Study (ACCORD-EYE). *Am J Cardiol*. 2007;99(12):S103–S111. doi.org/10.1016/j.amjcard.2007.03.028.
31. Gangnon RE, Davis MD, Hubbard LD, Aiello LM, Chew EY, Ferris FL, et al. A Severity Scale for Diabetic Macular Edema Developed from ETDRS Data. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(11):5041–7. doi.org/10.1167/iovs.08-2231.
32. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499-502. doi.org/10.1093/clinchem/18.6.499.
33. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci Technol*. 1995;28(1):25–30. [doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
34. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93(18):9821-9826. doi.org/10.1073/pnas.93.18.9821.
35. Matsudo S, Araujo T, Matsudo V, Andrade D, Andrade E, Oliveira LC, et al. Questionario Internacional de Atividade Fisica (IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. *International Physical Activity Questionnaire (IPAQ): study of validity and reliability in Brazil. Rev Bras Atividade Física Saúde*. 2001;6(2):5–18. doi.org/10.12820/rbafs.v.6n2p5-18.
36. World Health Organization, 2010. Global Recommendations on Physical Activity for Health. www.who.int. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241599979> (accessed 10 June 2023).
37. World Health Organization, 2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. <https://iris.who.int/handle/10665/42330> (accessed 22 June 2023).
38. Zhang Y, Kutateladze TG. Diet and the epigenome. *Nat Commun*. 2018;9:3375. doi.org/10.1038/s41467-018-05778-1.
39. Luo M, Yu C, Del B, Cruz P, Chen L, Ding D. Accelerometer-measured intensity-specific physical activity, genetic risk and incident type 2 diabetes: a prospective cohort study. *Br J Sports Med*. 2023;57(19):1257–1264. doi.org/10.1136/bjsports-2022-106653.
40. Amaravadi KS, Maiya GA, Vaishali K, Shastri BA. Effectiveness of structured exercise program on insulin resistance and quality of life in type 2 diabetes mellitus – A randomized controlled trial. *PLoS One*. 2024;19(5):e0302831. doi.org/10.1371/journal.pone.0302831.
41. Hassabi M, Salehi S, Hosein A, Yekta A, Esfahani MP. Association between physical activity and severity of diabetic retinopathy in patients with diabetes mellitus Association between physical activity and severity of diabetic retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Res Bull Med Sci*. 2020;25:E8.

42. Trott M, Driscoll R, Pardhan S. Associations between diabetic retinopathy and modifiable risk factors: An umbrella review of meta-analyses. *Diabet Med.* 2022;39(6):1–15. doi.org/10.1111/dme.14796.
43. Roekel V, Dugué P-A, Jung C-H, Joo JE, Makalic E, Wong EM, et al. Physical Activity, Television Viewing Time, and DNA Methylation in Peripheral Blood. *Med Sci Sport Exerc.* 2019;51(3):490–498. doi.org/10.1249/MSS.0000000000001827.
44. Rowlands DS, Page RA, Sukala WR, Giri M, Ghimbovski SD, Hayat I, et al. Multi-omic integrated networks connect DNA methylation and miRNA with skeletal muscle plasticity to chronic exercise in Type 2 diabetic obesity. *Physiol Genomics.* 2014;46(20):747–765. doi.org/10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00024.2014.
45. Hibler E, Huang L, Andrade J, Spring B. Impact of a diet and activity health promotion intervention on regional patterns of DNA methylation. *Clin Epigenetics.* 2019;11(133):1–12. doi.org/10.1186/s13148-019-0707-0.
46. Klemp I, Hoffmann A, Müller L, Hagemann T, Horn K, Rohde-Zimmermann K, et al. DNA methylation patterns reflect individual's lifestyle independent of obesity. *Clin Transl Med.* 2022;12(6):1–16. doi.org/10.1002/ctm2.851.
47. Mota MP, Santos ZA, Soares JFP, Pereira AF, João PV, Gaivão IO, et al. Intervention with a combined physical exercise training to reduce oxidative stress of women over 40 years of age. *Exp Gerontol.* 2019;123:1–9. doi.org/10.1016/j.exger.2019.05.002.
48. Zhao M, Xiao M, Tan Q, Lyu J, Lu F. The effect of aerobic exercise on oxidative stress in patients with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis. *Ren Fail.* 2023;45(2):1–15. doi.org/10.1080/0886022X.2023.2252093.
49. Kang Q, Yang C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Redox Biol.* 2020;37:101799. doi.org/10.1016/j.redox.2020.101799
50. Liu WL. MicroRNA-9 inhibits retinal neovascularization in rats with diabetic retinopathy by targeting vascular endothelial growth factor A. *J Cell Biochem.* 2019;120(5):8032–8043. doi.org/10.1002/jcb.28081

Authors' contributions The research project was conceptually developed by DCP, who also played a main role in securing funding, formulating the methodology, and overseeing project administration and supervision. BRVS conducted the formal analysis, led the investigation, and was primarily responsible for the original draft of the writing. The investigative team comprised BRVS, ASS, CSA, TGD, EJAF, MSD, MGMV and IWQE. DCP further contributed to the methodology and supervised the overall process. The collaborative effort also involved BRVS and DCP in the joint tasks of reviewing and editing the manuscript.

Funding This study was supported by Public Call n. 005/2020 Programa Pesquisa para o SUS - PPSUS - Paraíba State Research Foundation (FAPESQ, Paraíba, Brazil), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brasília, Brazil) Ministry of Health/Decit/SCTIE (Decit/SCTIE/MS), State Health Secretary (SES/Paraíba/Brazil); Grant 05/2021, Paraíba State Research Foundation (FAPESQ, Paraíba, Brazil) Grant 2395/2023. It was also supported by Public Call nº 03/2020 Produtividade em Pesquisa PROPEQS/PRPG/UFPB grant n. PIA13262-2020 and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Financial Code 001. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brasília, Brazil) the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brasília, Brazil) and the State of Paraíba Research Support Foundation (FAPESQ, Paraíba, Brazil).

Data availability The original contributions presented in this study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Ethics Declarations

Ethics approval The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the University Hospital Lauro Wanderley of the Federal University of Paraíba (Opinion n°: 3.053.068 and 4.917.746) and was conducted in accordance with Resolution 466/2012 of the National Health Council.

Conflict of Interest The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Consent for publication All authors approved the final manuscript and consent for publication.

Carbohydrate intake is associated with miR-9-3 methylation in patients with Diabetic Retinopathy

Bruno Rafael Virginio de Sousa ¹, Tainá Gomes Diniz ¹, Adélia da Costa Pereira de Arruda Neta, Cícera Daniely Honorato Medeiros ¹, Caroline Severo de Assis ¹; Marina Gonçalves Monteiro Viturino ⁴, Isabella Wanderley de Queiroga Evangelista ⁴, Alexandre Sérgio Silva ⁴, Naila Francis Paulo de Oliveira ³, Darlene Camati Persuhn ¹, *

¹ Laboratory of Molecular Studies Applied to Clinical Practice, Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil;

² Laboratory of Molecular Studies Applied to Clinical Practice, Department of Molecular Biology; Ophthalmology, Otolaryngology and Oral Maxillofacial Surgery Unit, Lauro Wanderley University Hospital, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil.

³ Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil

⁴ Laboratory for the Study of Physical Training Applied to Performance and Health, Department of Physical Education, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil;

⁵
* Corresponding author: Federal University of Paraíba, Campus I – Jardim Cidade Universitária, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil. ZIPCODE: 58051-900. E-mail: darlenecp@hotmail.com. ORCID: 0000-0001-5291-5454.

Abstract

Purpose: To analyze the influence of dietary intake on miR-9-3 methylation in patients with diabetic retinopathy (DR).

Methodology: A cross-sectional study was carried out with 170 participants with type 2 diabetes, consisting of a control group (n = 64) and a group with diabetic retinopathy (n = 106). Dietary intake was analyzed by 24-hour food recall. DNA extracted from leukocytes was analyzed for miR-9-3 methylation using PCR-MSP. In addition, glycemia, glycated hemoglobin, creatinine, total cholesterol, HDL-C, and triglycerides were analyzed.

Results: The methylation of miR-9-3 was more frequent in patients with diabetic retinopathy (61.3%) than in the type 2 diabetes control group (35.9%, p = 0.001). In the DR group, methylated patients had higher carbohydrate intake (p = 0.019) and thiamine intake (p = 0.034 for DM2 and p = 0.044 for DR) compared to non-methylated individuals, as well as higher riboflavin intake (p = 0.038). Carbohydrate intake (kcal) was an independent risk factor for miR-9-3 methylation (p = 0.000).

Conclusion: Carbohydrate intake is associated with miR-9-3 methylation in patients with diabetic retinopathy, indicating that diet may influence epigenetic modulation and the risk of microvascular complications, highlighting the importance of dietary interventions in disease management.

Keywords: Dietary intake, miR-9-3 Methylation, Diabetic Retinopathy, Epigenetic modulation

1. Introduction

Diabetic retinopathy (DR) is one of the main complications of type 2 diabetes mellitus (DM2), affecting around 30% of the diabetic population worldwide (Teo et al., 2021). DR is one of the leading causes of preventable blindness, especially among the adult working-age population (Ting et al., 2016). The main risk factors include glycemic control, duration of DM2 and hypertension arterial, in addition to other factors, obesity, hyperlipidemia, male gender, ethnicity and genetic predisposition (Scanlon, 2022).

Traditional risk factors for DR, such as those associated with diabetes, may not be enough to fully explain its occurrence. Epigenetic factors, including changes in DNA methylation, histone modification and the expression of non-coding RNAs, such as microRNAs (miRNAs), play important roles in the development and progression of DR. Due to their high sensitivity and specificity, miRNAs have shown promise as non-invasive biomarkers for the early detection and monitoring of DR, affecting processes such as microvascularization and dyslipidemia (Smit-Mcbride et al., 2020).

MicroRNA-9 (miR-9) is encoded by three independent loci in the DNA, and its expression is influenced by methylation in the gene's promoter region (Hildebrandt et al. 2010). In patients with DM2, an increase in miR-9 in pancreatic β -cells can regulate insulin secretion by modulating proteins such as granulophilin and OC2 (Plaisance et al. 2006), as well as inhibiting the deacetylase Sirt1, influencing glucose homeostasis (Ramachandran et al. 2011). Recent studies show that the methylated profile of miR-9-3 is associated with an increased risk of developing DR (Dos Santos Nunes et al. 2018; De Assis et al. 2021), as well as being related to high levels of VEGF-A in patients with DR (Sousa et al. 2024).

Based on the results, there is a clear need to further understand the role of miR-9-3 in DR, especially in epigenetic control mechanisms. Epigenetic modifications, such as DNA methylation and changes in histones, are influenced by dietary components, which can either promote or inhibit gene function (Acevedo-Espinola et al., 2024). In this sense, diet may be associated with the methylation of miR-9-3, influencing its expression and, consequently, the progression of DR.

The aim of this study was to verify the influence of dietary intake on miR-9-3 methylation in patients with diabetic retinopathy (DR).

2. Methodology

2.1 Type of study and ethical aspects

This is a cross-sectional study of 170 patients treated at the Lauro Wanderley University Hospital (UFPB) between 2019 and 2022. Patients with DM2 for at least 5 years and a minimum age of 40 were included. Those with diabetes mellitus type 1 (DM1), a DM2 diagnosis of less than 5 years, an age below 40 years or insufficient samples for methylation analysis were excluded. The study was approved by the hospital's Ethics Committee (CAAE: 99840118.3.0000.5183) and complied with current ethical standards.

2.2 Clinical assessment of diabetic retinopathy

The retina was assessed using indirect binocular ophthalmoscopy, after pupil dilation with 0.5% tropicamide, and images of the macula and central disc were captured using a fundus camera. The diagnosis and classification of diabetic retinopathy (DR) followed the standards of the ACCORD (Chew et al. 2007) and the ETDRS (Gangnon et al. 2008), carried out by specialized ophthalmologists. The control group (n = 64) included patients with type 2 diabetes mellitus (DM2) without DR, while the DR group (n = 106) consisted of patients with retinopathy.

2.3 Blood collection and biochemical analysis

Twenty ml of venous blood was collected after a 12-hour fast. DNA and HbA1C were extracted from samples in tubes with K3EDTA, while biochemical analyses were carried out in tubes with clot activator. Serum/plasma was separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 minutes. Fasting blood glucose, total cholesterol, HDL and triglycerides were analyzed by enzymatic methods, while creatinine and HbA1c were analyzed by kinetic and turbidimetric techniques, respectively. The Friedewald formula was used to calculate LDL. The analyses were carried out on an automatic analyzer, following the instructions of the commercial kits.

2.4 DNA isolation and methylation analysis

DNA from leukocytes was isolated using the GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) for methylation analysis. Methylation-specific PCR (MS-PCR) used sodium bisulfite to convert unmethylated cytosines into uracil, while methylated cytosines remained unchanged. Detection of miR-

9-3 methylation was performed with specific primers and Dream Taq™ Hot Start (Thermo Fisher Scientific), as described by Dos Santos Nunes et al. (2018). The PCR products were analyzed by electrophoresis in 3% agarose gel with GelRed® and visualized under ultraviolet light. The sample was classified as methylated when detected in both conditions and unmethylated when the band appeared only in the unmethylated condition.

2.5 Food intake assessment

A 24-hour food recall was used to identify and quantify the food and drink consumed in the 24 hours prior to the interview (Gibson, 2005). Participants provided detailed information such as preparation method, commercial brand of processed food and portion size. Two recalls were applied to estimate the intrapersonal variability of the diet and increase the accuracy of the dietary intake estimate (Verly-Jr et al., 2012). The data collected was analyzed by a specialist nutritionist using the Brasil Nutri® software and habitual energy and nutrient intake was estimated using the Multiple Source Method (MSM), a statistical method used to estimate habitual dietary intake based on two or more short-term measurements (Harttig et al. 2011).

2.6 Anthropometric analysis

Body mass (kg) and height (m) were assessed using a weight scale (Omron Healthcare Brasil, São Paulo, Brazil) and a portable stadiometer (Sanny, Standard, São Paulo, Brazil). (BMI) and the participants were classified according to the cut-off points proposed by the World Health Organization (Who, 2000). In addition, waist and hip circumferences were measured with an inextensible tape (Sanny, Standard, São Paulo, Brazil).

2.7 Statistical analysis

Continuous data was presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) or median and interquartile range (IQR), and categorical variables as absolute and relative frequency. The normality of continuous data was checked using the Kolmogorov-Smirnov test. The independent t-test or Mann-Whitney test (continuous variables) and the chi-square or Fisher's exact test (categorical variables) were used to compare groups. Values of $p < 0.05$ were considered significant, and the data was analyzed using SPSS version 26 (IBM

SPSS, Chicago, IL, USA).

3. Results

Table 1 shows the general characteristics of the study population. In the DR group, a higher proportion of men were observed in the methylated miR-9-3 profile compared to the unmethylated one ($p < 0.017$). In the control group (DM2), plasma triglyceride levels were significantly higher in the methylated profile ($p < 0.016$). There were no significant differences in the other variables.

Table 1. General characteristics of study participants (n = 170)

	DM2 control			DR		
	Unmet. (n = 41)	Met. (n = 23)	P	Unmet. (n = 41)	Met. (n = 65)	P
Age (years)	60.1 ± 12	60.3 ± 10.2	0.945	60.2 ± 8.7	61.4 ± 8.8	0.468
Sex, n (%)						
Female	32 (78)	14 (60.9)	0.142	28 (68.3)	29 (44.6)	0.017*
DM2 duration (years)	8 (5)	9 (5)	0.220	15 (10)	17 (9)	0.506
Insulin treat, n (%)						
Yes	17 (41.5)	10 (43.5)	0.876	28 (68.3)	43 (66.2)	0.820
SBP (mmHg)	130 (20)	130 (20)	0.740	150 (40)	150 (30)	0.779
DBP (mmHg)	80 (10)	80 (10)	0.823	90 (20)	90 (20)	0.717
BMI (kg/m ²)	30.5 ± 5.5	29.5 ± 3.7	0.428	28.5 ± 4.9	29 ± 4.3	0.609
WHR (cm)	0.96 ± 0.07	0.95 ± 0.05	0.476	0.94 ± 0.04	0.96 ± 0.05	0.072
Glycemia (mg/dL)	136 (67)	127 (39.5)	0.463	134 (72)	132 (58)	0.753
HbA1c (%)	7.8 (2.1)	7.2 (1.3)	0.114	7.4 (1.4)	7.2 (1.5)	0.267
Creatinine (mg/dL)	0.68 (0.35)	0.80 (0.23)	0.218	0.81 (0.40)	0.93 (4.45)	0.115
Triglycerides (mg/dL)	116 (79)	155 (46.5)	0.016*	115 (42)	110 (64)	0.536
TC (mg/dL)	161.8 ± 35.3	157.4 ± 37.5	0.642	171.4 ± 40	159.6 ± 43	0.239
HDL-c (mg/dL)	38 (12)	38 (14.5)	0.547	45 (16)	40 (14)	0.167
LDL-c (mg/dL)	96.9 ± 34.3	84.9 ± 37	0.191	103 ± 37	95.8 ± 36.8	0.235

Data expressed as mean $\pm$ SD or median and (IQR), n (%). In the DM2 control group versus DR group the data were analyzed by independent t test or Mann-Whitney U test. The chi-square test was used to compare categorical variables. Statistical significance = < 0.05 . SAH = Systolic Arterial Hypertension; SBP = Systolic Blood Pressure; DBP = Diastolic Blood Pressure; PAL = Physical Activity Level; BMI = Body Mass Index; WHR: Waist-Hip Ratio; HbA1c: Glycated hemoglobin; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c: low-density lipoprotein cholesterol.

Comparisons between the methylation profiles of miR-9-3 in the two clinical groups showed that methylation was more frequent in the group with DR (n = 65; 61.3%) compared to the DM2 control group (n = 23; 35.9%). This difference was statistically significant (p = 0.001).

Table 2 shows dietary intake according to the miR-9-3 methylation profile. It was observed that carbohydrate intake, both in grams and kilocalories, was significantly higher in DR group among methylated patients compared to non-methylated patients (p = 0.019). Regarding micronutrients, the intake of thiamine (vitamin B1) was significantly higher in both groups: DM2 and DR, in methylated patients compared to non-methylated patients (p = 0.034 and 0.044, respectively). In the DR group, there was also a significantly higher intake of riboflavin (vitamin B2) in methylated patients compared to non-methylated patients (p = 0.038).

Table 2. Dietary intake according to miR-9-3 methylation profile (n = 170)

	DM2 control			DR		
	Unmt. (n = 23)	Met. (n = 41)	P	Unmt. (n = 41)	Met (n = 65)	P
Total Calories (kcal)	1153,1 ± 123,8	1204,7 ± 189,2	0,246	1225,1 ± 217	1299,8 ± 177	0,056
Carbohydrate (g)	150,9 ± 18,7	162,2 ± 23,4	0,051	158,2 ± 24,7	168,4 ± 19,2	0.019*
Carbohydrate (kcal)	603,7 ± 74,8	649,1 ± 93,9	0,051	632,9 ± 98,8	673,7 ± 76,9	0.019*
Protein (g)	67,9 ± 8,7	67,3 ± 8,5	0,776	71 ± 10,7	72,4 ± 11,3	0.515
Protein (kcal)	271,9 ± 35,1	269,3 ± 34,2	0,776	284,2 ± 43,1	289,9 ± 45	0.515
Fat (g)	35,9 ± 7,4	36,3 ± 7,6	0,828	38 ± 9,8	39,5 ± 7,2	0,374
Fat (kcal)	323,5 ± 67,2	327,4 ± 68,9	0,828	342,1 ± 88,8	355,4 ± 65	0,374
Cholesterol (mg)	305,0 ± 69,5	300,7 ± 68,7	0,809	294 ± 72,9	312,8 ± 80,5	0.228
Fiber (g)	16,0 ± 1,8	16,0 ± 1,8	0,866	15,9 ± 2,6	16,2 ± 2,1	0.552
Saturated fat (g)	12,4 ± 2,8	12,9 ± 2,8	0,496	13,4 ± 3,4	13,9 ± 7	0.480
Monounsaturated fat (g)	11,0 ± 2,3	11,1 ± 2,1	0,927	12 ± 3,3	12,4 ± 2,6	0.466
Polyunsaturated fat (g)	8,0 ± 1,3	7,8 ± 1,6	0,552	8,2 ± 2,3	8,3 ± 1,8	0.812
Trans fat (g)	0.80 ± 0.2	0.80 ± 0.2	0,838	0.80 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.485
Vitamin A (mg)	476,8 ± 207,7	462,6 ± 199,6	0,789	423,4 ± 112	414 ± 133	0,710

Vitamin E (mcg)	4,9 ± 0,9	4,7 ± 0,7	0,374	4,7 ± 0,7	4,8 ± 0,8	0.416
Vitamin C (mcg)	136,1 ± 49,8	122,5 ± 49,7	0,298	131,9 ± 69	151,2 ± 63	0.146
Vitamin D (mcg)	1,3 ± 0,8	1,5 ± 0,7	0,196	1,5 ± 0,4	1,5 ± 0,5	0.668
Thiamine (mcg)	0,64 ± 0,0	0,70 ± 0,1	0,037*	0,67 ± 0,1	0,72 ± 0,1	0,044*
Riboflavin (mcg)	0,74 ± 0,2	0,87 ± 0,2	0,072	0,85 ± 0,2	0,96 ± 0,2	0,038*
Niacin (mcg)	19,1 ± 0,2	18,9 ± 0,2	0,556	19,1 ± 0,8	19,2 ± 0,7	0,818
Pyridoxin (mcg)	0,41 ± 0,0	0,44 ± 0,1	0,350	0,44 ± 0,1	0,49 ± 0,1	0,051
Vitamin B12 (mcg)	3,2 ± 0,8	3,4 ± 0,7	0,234	3,6 ± 0,7	3,4 ± 0,7	0.243
Calcium (mg)	367,6 ± 74,8	390,0 ± 80,7	0,280	386,7 ± 71,6	395,4 ± 79	0,572
Magnesium (mg)	188,7 ± 23,7	193,0 ± 24,6	0,495	192,1 ± 26,2	192,7 ± 27,5	0.916
Sodium (mg)	1730,5 ± 259,4	1747,9 ± 298,1	0,815	1858,5 ± 452	2063,3 ± 438	0,023*
Potassium (mg)	1906,6 ± 166,6	1942,0 ± 233,8	0,525	1922,8 ± 196	1937 ± 243	0,754
Phosphorus (mg)	831,9 ± 84,6	843,5 ± 91,1	0,618	855,5 ± 97,6	872,1 ± 104	0,415
Copper (mg)	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,691	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,292
Zinc (mg)	7,7 ± 1,3	7,8 ± 1,5	0,754	8,3 ± 1,9	8,4 ± 1,7	0792

Data expressed as mean ± SD. Data analysed by independent t test. * < 0.05 = statistically significant difference. Unmt. = Unmetylated; Met. = Metylated.

Table 3 presents the logistic regression analysis, where the methylation profile of miR-9-3 was considered the dependent variable and carbohydrate intake the independent variable. Carbohydrate intake (kcal) was shown to be an independent risk factor, regardless of HbA1c, sodium intake, potassium, systemic arterial hypertension, thiamine, and riboflavin intake ($p = 0.000$).

Table 3. Logistic regression models verifying the influence of Carbohydrate intake on miR-9-3 methylation

Predictor Variables	β (SE)	OR	IC 95%
Carbohydrate intake (Kcal)	1.657 ± 0.609	5.243*	1.588-17.306
HbA1c (%)	0.209 ± 0.184	1.232	0.859-1.757
Sodium intake (mg)	0.512 ± 0.582	1.668	0.533-5.221
Potassium intake (mg)	0.002 ± 0.001	1.002	1.000-1.005
HAS (years)	-0.051 ± 0.029	0.950	0.898-1005
Thiamin intake (mg)	-2.814 ± 2.606	0.060	0.000-9.908
Riboflavin intake (mg)	0.617 ± 1.053	1.854	0.235-14.614

Variables tested by Binary Logistic Regression. Dependent variable: miR-9-3 methylation; Independent variable: Carbohydrate intake (Kcal); B = beta regression coefficient $\pm$ standard error; OR = odds ratio; CI 95% = upper and lower odds limits; HAS = Systemic arterial hypertension; * < 0.05 = statistically significant difference.

4. Discussion

The results of this study highlight relevant differences in the methylation profile of miR-9-3 in patients with diabetic retinopathy (DR), suggesting significant implications for the pathophysiology of the disease and for the modulation of metabolic and dietary risk factors.

The higher frequency of methylation in the DR group compared to the DM2 group supports the hypothesis that miR-9-3 plays a crucial role in the progression of microvascular complications. Previous studies, such as those by Dos Santos Nunes et al. (2021) and De Assis et al. (2021), have also observed associations between the methylation of this microRNA and DR, suggesting its potential as a biomarker for risk stratification in diabetics.

Regarding dietary intake, a higher carbohydrate intake was observed among patients with methylated DR. Notably, carbohydrate intake remained significant in the logistic regression analysis, even after adjusting for potential confounding variables such as HbA1c, sodium intake, potassium intake, systemic arterial hypertension, as well as thiamine and

riboflavin intake. The literature already suggests that high carbohydrate consumption can modulate the expression of genes involved in the progression of diabetic complications, as demonstrated by Mochizuki et al. (2021). Diets with a high glycemic index (GI) or glycemic load (GL) can induce epigenetic changes, affecting genes related to carbohydrate metabolism and insulin sensitivity, contributing to the pathogenesis of diabetes and its complications (Ott et al., 2023).

In addition, sodium consumption was also higher in the methylated DR group, reinforcing the association between high sodium intake and the miR-9-3 methylation profile. Studies such as that by Liao et al. (2022) show that excess sodium can lead to epigenetic changes, as well as exacerbating vascular disorders that worsen microvascular complications such as retinopathy (Zhang et al., 2023).

Finally, the higher intake of thiamine among methylated patients suggests a possible modulating role for these micronutrients in epigenetic regulation. Previous studies, such as those by Ziegler et al. (2023), indicate that thiamine deficiency can aggravate microvascular complications, reinforcing the importance of an adequate intake of this vitamin as part of the prevention of complications such as DR. However, our findings on riboflavin were consistent with the study by She et al. (2021), which found no significant association between riboflavin intake and DR.

Despite observing higher sodium, thiamine, and riboflavin intake among methylated patients, these nutrients did not show statistical relevance in the logistic regression model tested.

These results provide new insights into the role of diet in the epigenetic regulation of diabetic patients, suggesting that nutritional interventions focused on controlling carbohydrate intake may influence not only glycemic control but also the methylation of genes associated with the development of DR.

5. Conclusion

The findings of this study reinforce the importance of considering both epigenetic and dietary factors in the progression of diabetic retinopathy. The association between miR-9-3 methylation and high carbohydrate and sodium intake highlights the potential role of diet in epigenetic modulation and the risk of microvascular complications. Nutritional interventions aimed at reducing carbohydrate intake may improve control of the disease and its complications.

Acknowledgements

We would like to thank Lauro Wanderley University Hospital (HUWL), Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil in particular to the Ophthalmology, Otolaryngology and Oral and Maxillofacial Surgery Unit and Endocrinology Outpatient Clinic and all participants in the study for participation and the financial support institutions, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brasília, Brazil), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brasília, Brazil) and the State of Paraíba Research Support Foundation (FAPESQ, Paraíba, Brazil).

Funding: This study was supported by Public Call n. 005/2020 Programa Pesquisa para o SUS - PPSUS - Paraíba State Research Foundation (FAPESQ, Paraíba, Brazil), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brasília, Brazil) Ministry of Health/Decit/SCTIE (Decit/SCTIE/MS), State Health Secretary (SES/Paraíba/Brazil); Grant 05/2021, Paraíba State Research Foundation (FAPESQ, Paraíba, Brazil) Grant 2395/2023. It was also supported by Public Call nº 03/2020 Produtividade em Pesquisa PROPESQ/PRPG/UFPB grant n. PIA13262-2020 and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Financial Code 001. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brasília, Brazil) the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brasília, Brazil) and the State of Paraíba Research Support Foundation (FAPESQ, Paraíba, Brazil).

Data availability: The original contributions presented in this study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Ethics Declarations: The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the University Hospital Lauro Wanderley of the Federal University of Paraíba (Opinion nº: 3.053.068 and 4.917.746) and was conducted in accordance with Resolution 466/2012 of the National Health Council.

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Teo, Z. L., Tham, Y. C., Yu, M., Chee, M. L., Rim, T. H., Cheung, N., ... & Cheng, C. Y. (2021). Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*, 128(11), 1580-1591.
- Ting, D. S. W., Cheung, G. C. M., & Wong, T. Y. (2016). Diabetic retinopathy: global prevalence, major risk factors, screening practices and public health challenges: a review. *Clinical & experimental ophthalmology*, 44(4), 260-277.
- Scanlon, P. H. (2022). Improving the screening of risk factors in diabetic retinopathy. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 17(3), 235-243.
- Smit-McBride, Z., Nguyen, A. T., Yu, A. K., Mujtahid, S. P., Hunter, A. A., Rashid, S., ... & Morse, L. S. (2020). Unique molecular signatures of microRNAs in ocular fluids and plasma in diabetic retinopathy. *PLoS One*, 15(7), e0235541.
- Hildebrandt, M. A. T., Gu, J., Lin, J., Ye, Y., Tan, W., Tamboli, P., ... & Wu, X. (2010). Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*, 29(42), 5724-5728.
- Plaisance, V., Abderrahmani, A., Perret-Menoud, V., Jacquemin, P., Lemaigre, F., & Regazzi, R. (2006). MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(37), 26932-26942.
- Ramachandran, D., Roy, U., Garg, S., Ghosh, S., Pathak, S., & Kolthur-Seetharam, U. (2011). Sirt1 and mir-9 expression is regulated during glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -islets. *The FEBS journal*, 278(7), 1167-1174.
- dos Santos Nunes, M. K., Silva, A. S., de Queiroga Evangelista, I. W., Modesto Filho, J., Gomes, C. N. A. P., do Nascimento, R. A. F., ... & Persuhn, D. C. (2018). Analysis of the DNA methylation profiles of miR-9-3, miR-34a, and miR-137 promoters in patients with diabetic retinopathy and nephropathy. *Journal of Diabetes and its Complications*, 32(6), 593-601.
- de Assis, C. S., Silva, A. S., dos Santos Nunes, M. K., Filho, J. M., do Nascimento, R. A., Gomes, C. N. A. P., ... & Persuhn, D. C. (2021). Methylation profile of miR-9-1 and miR-9-1/-9-3 as potential biomarkers of diabetic retinopathy. *Current Diabetes Reviews*, 17(6), 84-92.
- Sousa, B. R. V., Silva, A. S., de Assis, C. S., Diniz, T. G., Viturino, M. G. M., de Queiroga Evangelista, I. W., ... & Persuhn, D. C. (2024). MiR-9-3 hypermethylation is associated with stages of diabetic retinopathy. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 1-10.
- Acevedo-Espinola, R., Allcca-Luna Victoria, R. M., Olivares-Etchebaster, M., & Tume, F. (2024). Epigenetics and diet: how does food regulate our genes?.
- Chew, E. Y., Ambrosius, W. T., Howard, L. T., Greven, C. M., Johnson, S., Danis, R. P., ... & ACCORD Study Group. (2007). Rationale, design, and methods of the action to control cardiovascular risk in diabetes eye study (ACCORD-EYE). *The American Journal of Cardiology*, 99(12), S103-S111.

Gangnon, R. E., Davis, M. D., Hubbard, L. D., Aiello, L. M., Chew, E. Y., Ferris, F. L., ... & Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. (2008). A severity scale for diabetic macular edema developed from ETDRS data. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(11), 5041-5047.

Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18(6), 499–502. <https://doi.org/10.1093/clinchem/18.6.499>

Gibson, R. S. (2005). *Principles of nutritional assessment*. Oxford university press, USA.

Verly-Jr, E., Castro, M. A., Fisberg, R. M., & Marchioni, D. M. L. (2012). Precision of usual food intake estimates according to the percentage of individuals with a second dietary measurement. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112(7), 1015-1020.

Harttig, U., Haubrock, J., Knüppel, S., & Boeing, H. (2011). The MSM program: web-based statistics package for estimating usual dietary intake using the Multiple Source Method. *European journal of clinical nutrition*, 65(1), S87-S91.

World Health Organization. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation.

Mochizuki, K., Ishiyama, S., Hariya, N., & Goda, T. (2021). Regulation of carbohydrate-responsive metabolic genes by histone acetylation and the acetylated histone reader BRD4 in the gene body region. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 682696.

Ott, R., Stein, R., Hauta-Alus, H. H., Ronkainen, J., Fernández-Barrés, S., Spielau, U., ... & Hummel, S. (2023). Epigenome-Wide Meta-analysis Reveals Associations Between Dietary Glycemic Index and Glycemic Load and DNA Methylation in Children and Adolescents of Different Body Sizes. *Diabetes Care*, 46(11), 2067-2075.

Liao, Y., Chu, C., Yan, Y., Wang, D., Ma, Q., Gao, K., ... & Mu, J. (2022). High dietary salt intake is associated with histone methylation in salt-sensitive individuals. *Frontiers in Nutrition*, 9, 857562.

Zhang, M., Wu, J., Wang, Y., Wu, J., Hu, W., Jia, H., & Sun, X. (2023). Associations between blood pressure levels and diabetic retinopathy in patients with diabetes mellitus: A population-based study. *Heliyon*, 9(6).

Ziegler, D., Reiners, K., Strom, A., & Obeid, R. (2023). Association between diabetes and thiamine status-A systematic review and meta-analysis. *Metabolism*, 144, 155565.

She, C., Shang, F., Cui, M., Yang, X., & Liu, N. (2021). Association between dietary antioxidants and risk for diabetic retinopathy in a Chinese population. *Eye*, 35(7), 1977-1984.

ANEXOS

ANEXO A – RECORDATÓRIO ALIMENTAR DE 24 HORAS

Refeições/Alimentos		Medida Caseira	Tamanho da porção	Valor em gramas/ml	Observações
Café Da Manhã					Preencher as medidas mostrando o álbum de medidas caseiras. Para mensurar o valor de g/ml das medidas caseiras, considerar o valor da porção média do QFCA, Se for pequena, / 2 Se for grande, + ½ Se for extra-grande, X 2 (p25 – p50 – p75 – p100)
Lanche					Descrever quantidades de alimentos por preparação: Papas, sopas, macarronada, feijoadas, etc. E colocar neste recordatório, perguntado a responsável pela preparação, para quantas pessoas será dividida.
Almoço					Descrever neste recordatório se consome chá, caso sim, que tipo de chá, como também quantidade de água e horário. Descrever o tipo de cocção: - Fritura -Grelhado -Cozido - Assado
Lanche					
Jantar					
Lanche Noturno					
Preferências Alimentares:					

ANEXO B – QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR (QFA)

As questões seguintes relacionam-se ao seu hábito alimentar usual no PERÍODO DE UM ANO. Para cada quadro responda, por favor, a frequência que melhor descreva QUANTAS VEZES você costuma comer cada item e a respectiva UNIDADE DE TEMPO (se por dia, por semana, por mês ou no ano). Depois responda qual a sua PORÇÃO INDIVIDUAL USUAL em relação à porção média indicada. ESCOLHA SOMENTE UM CÍRCULO PARA CADA COLUNA. Muitos grupos de alimentos incluem exemplos. Eles são sugestões e você pode consumir todos os itens indicados. Se você não come ou raramente come um determinado item, preencha o círculo da primeira coluna (N=nunca come). NÃO DEIXE ITENS EM BRANCO.

GRUPO DE ALIMENTOS	Com que frequência você costuma comer?		Qual o tamanho de sua porção em relação à porção média?	
	QUANTAS VEZES VOCÊ COME:	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
ALIMENTOS E PREPARAÇÕES	Número de vezes: 1, 2, 3, etc. (N = nunca ou raramente comeu no último ano)	D=por dia S=por semana M=por mês A=por ano	Porção média de referência	P = menor que a porção média M = igual à porção média G = maior que a porção média E = bem maior que a porção média

SOPAS E MASSAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME										UNIDADE				PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO				
Sopas (de legumes, canja, creme, etc)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 concha média (150g)	P	M	G	E
Salgados fritos (pastel, coxinha, risólis, bolinha)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 unidade grande (80g)	P	M	G	E
Salgados assados (esfiha, bauruzinho, torta)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	2 unidades ou 2 pedaços médios (140g)	P	M	G	E
Macarrão com molho sem carne	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 prato raso (200g)	P	M	G	E
Macarrão com molho com carne, lasanha, nhoque	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 escumadeira ou 1 pedaço pequeno (110g)	P	M	G	E
Pizza, panqueca	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	2 fatias pequenas ou 2 unidades (180g)	P	M	G	E
Polenta cozida ou frita	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	2 colheres de sopa ou 2 fatias pequenas (70g)	P	M	G	E

CARNES E PEIXES	QUANTAS VEZES VOCÊ COME										UNIDADE				PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO				
Carne de <u>boi</u> (bife, cozida, assada), <u>miúdos</u> , <u>vísceras</u>	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 bife médio ou 2 pedaços (100g)	P	M	G	E
Carne de <u>porco</u> (lombo, bisteca)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 fatia média (100g)	P	M	G	E
Carne <u>saca</u> , carne de sol, bacon	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	2 pedaços pequenos (40g)	P	M	G	E
<u>Linguiça</u>	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 <u>gomo</u> média (60g)	P	M	G	E
<u>Embutidos</u> (presunto, mortadela, salsicha)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	2 <u>fatias médias</u> (30g)	P	M	G	E
<u>Frango</u> (cozido, frito, grelhado, assado)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 <u>pedaço</u> ou 1 <u>filé</u> pequeno (60g)	P	M	G	E
<u>Hambúrguer</u> , nuggets, <u>almôndega</u>	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 <u>unidade média</u> (60g)	P	M	G	E
<u>Peixe</u> (cozido, frito, assado) e <u>frutos do mar</u>	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 <u>filé pequeno</u> ou 1 <u>posta pequena</u> (100g)	P	M	G	E

LEITE E DERIVADOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME										UNIDADE				PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO				
Leite - tipo: () integral () desnatado () semi-desnatado	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1/2 copo requeijão, (125ml)	P	M	G	E
Iogurte - tipo: () natural () com frutas	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 unidade pequena, (140g)	P	M	G	E
Queijo mussarela, prato, parmesão, provolone	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 1/2 fatias grossas, (30g)	P	M	G	E
Queijo minas, ricota	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 fatia média (30g)	P	M	G	E

LEGUMINOSAS E OVOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME											UNIDADE				PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO			
<u>Ovo (cozido, frito)</u>	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 unidade (50g)	P	M	G	E
<u>Feijão (carioca, roxo, preto, verde)</u>	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 concha média (80g)	P	M	G	E
<u>Lentilha, ervilha seca, grão de bico, soja</u>	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 colher de servir (35g)	P	M	G	E
<u>Feijoadas, feijão tropeiro</u>	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 concha média (210g)	P	M	G	E

ARROZ E TUBÉRCULOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME										UNIDADE				PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO				
Arroz branco ou integral cozida com óleo e temperos	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	2 escumadeiras médias (120g)	P	M	G	E
Batata frita ou mandioca frita	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	2 colheres de servir cheias (100g)	P	M	G	E
Batata, mandioca, inhame (cozida ou assada), purê	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 escumadeira cheia (90g)	P	M	G	E
Salada de maionese com legumes	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	3 colheres de sopa (90g)	P	M	G	E
Farinha de mandioca, farofa, cuscuta, aveia, tapioca	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	3 colheres de sopa (40g)	P	M	G	E

VERDURAS E LEGUMES	QUANTAS VEZES VOCÊ COME										UNIDADE				PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO				
Alface	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	3 folhas médias (30g)	P	M	G	E
Tomate	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	3 fatias médias (40g)	P	M	G	E
Cenoura	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 colher de sopa (25g)	P	M	G	E
Outros legumes (abobrinha, berinjela, chuchu, pepino)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 colher de sopa cheia (30g)	P	M	G	E
Outras verduras cruas (acelga, rúcula, agrião)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 prato de sobremesa (38g)	P	M	G	E
Outras verduras cozidas (acelga, espinafre, escarola, couve)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 colher de servir (30g)	P	M	G	E
Brócolis, couve-flor, repolho	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 ramo ou 2 colheres de sopa (30g)	P	M	G	E

MOLHOS E TEMPEROS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME											UNIDADE				PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO			
Óleo, azeite ou vinagrete para tempero de salada	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 fio (5ml)	P	M	G	E
Maionese, molho para salada, patê, chantilly	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 colher de chá (4g)	P	M	G	E
Sal para tempero de salada	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 pitada (0,35g)	P	M	G	E
Condimentos	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 pitada (0,35g)	P	M	G	E

FRUTAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME										UNIDADE				PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO				
Laranja, mexerica, abacaxi	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 unidade média ou 1 fatia grande (180g)	P	M	G	E
Banana	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 unidade média (86g)	P	M	G	E
Maçã, pêra	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 unidade média (110g)	P	M	G	E
Melão, melancia	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 fatia média (150g)	P	M	G	E
Mamão	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 fatia média ou ½ unidade média (160g)	P	M	G	E
Goiaba	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 unidade grande (225g)	P	M	G	E
Abacate	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	2 colheres de sopa cheias (90g)	P	M	G	E

BEBIDAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME										UNIDADE				PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO				
Suco natural	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1/2 copo Americano (80ml)	P	M	G	E
Suco industrializado	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 copo de requeijão (240ml)	P	M	G	E
Café ou chá sem açúcar	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	2 xícaras de café (90ml)	P	M	G	E
Café ou chá com açúcar	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	2 xícaras de café	P	M	G	E
Refrigerante () comum () diet/light	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 copo de requeijão (240ml)	P	M	G	E
Cerveja	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	2 latas (700ml)	P	M	G	E

PÃES E BISCOITOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME										UNIDADE				PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO				
Pão francês, pão de forma, integral, pão doce, torrada	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 unidade ou 2 fatias (50g)	P	M	G	E
Biscoito sem recheio (doce, salgado)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	4 unidades (24g)	P	M	G	E
Biscoito recheado, waffer, amanteigado	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	3 unidades (41g)	P	M	G	E
Bolo (simples, recheado)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 fatia média (60g)	P	M	G	E
Manteiga ou margarina passada no pão, () comum () light	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	3 pontas de faca (15g)	P	M	G	E
Sanduíche (cachorro-quente, hambúrguer)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	2 unidades simples (220g)	P	M	G	E

DOCES E SOBREMESAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME										UNIDADE				PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO				
Chocolate, bombom, brigadeiro	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 barra pequena, (25g)	P	M	G	E
Achocolatado em pó (adicionada ao leite)	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	2 colheres de sopa (25g)	P	M	G	E
Sobremesas, doces, tortas e pudins	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1 pedaço ou 1 fatia média (60g)	P	M	G	E
Açúcar, mel, geléia	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1/2 colher de sopa (8g)	P	M	G	E

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre ***Epigenética + genética: identificação de marcadores para Retinopatia Diabética*** e está sendo desenvolvida por Tainá Gomes Diniz, Caroline Severo de Assis e Bruno Rafael Virginio de Sousa todos doutorandos do Curso de Pós Graduação em Ciências da Nutrição da Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação da Profa Darlene Camati Persuhn.

Os objetivos do estudo são estudar se alguns genes presentes nas suas células apresentam versões que podem estar relacionadas às complicações da diabetes que acontecem numa região dos olhos denominada retina. A finalidade deste trabalho é contribuir para identificar marcadores genéticos e precoces da retinopatia diabética, podendo abrir caminho para identificação antecipada de indivíduos com risco da complicação ou da sua rápida progressão.

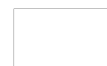
Solicitamos a sua colaboração para 1) *responder algumas questões sobre sua condição de saúde, medicamentos que toma, e o conhecimento que possui sobre diabetes utilizando questionários apropriados que demorarão em torno de 20 minutos*, 2) *permitir aos pesquisadores determinar seu peso em balança apropriada; altura, medida da cintura e quadril utilizando fita métrica*; 3) *Permitir a realização do exame de fundo de olho para o diagnóstico da retinopatia diabética* 4) *permitir a coleta de uma amostra de sangue equivalente a 30mL ou 3 colheres de sopa, que servirá para determinação das taxas bioquímicas importantes para o estudo (colesterol, HDL, triglicerídeos, glicose, hemoglobina glicada, creatinina) e variáveis bioquímicas relacionadas aos genes estudados. A mesma amostra de sangue será utilizada para isolamento do DNA cromossomal que permitirá analisar os marcadores genéticos que você possui.* Solicitamos ainda sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo absoluto.

Informamos que a coleta de sangue pode trazer um pequeno desconforto local e a presença de hematoma discreto que tende a desaparecer em poucos dias. Caso ocorra dor ou aparecimento de hematoma devido a coleta de sangue, você deverá entrar em contato com os pesquisadores e será orientado sobre a utilização de compressas e utilização de medicamentos de uso tópico. Por participar deste projeto, sua condição de diabético pode ficar exposta, no entanto, toda a identificação de materiais será realizada através de códigos para evitar sua exposição.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição. Os pesquisadores estarão à sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Assinatura do(a) pesquisador(a) responsável

Considerando, que fui informado(a) dos objetivos e da relevância do estudo proposto, e como será minha participação, dos procedimentos e riscos decorrentes deste estudo, declaro o meu consentimento em participar da pesquisa, como também concordo que os dados obtidos na investigação sejam utilizados para fins científicos (divulgação em eventos e publicações). Estou ciente que receberei uma via desse documento.



João Pessoa, _____ de _____ de _____

Impressão dactiloscópica

Assinatura do participante ou responsável legal

Contato com o Pesquisador (a) Responsável:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para o (a) pesquisador (a) Profa. Dra. Darlene Camati Persuhn Telefone: 83 999423268, email darlenecp@hotmail.com ou para o Comitê de Ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley -Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW – 2º andar. Cidade Universitária. Bairro: Castelo Branco – João Pessoa - PB. CEP: 58059-900. E-mail: cep.hulw@ebserh.gov.br Campus I – Fone: 3206--0704

ANEXO D – INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS

INSTRUMENTO PARACOLETA DE DADOS

Nome do entrevistador: _____	Nº de identificação: _____
Nome: _____	Sexo () F () M
Idade atual: _____	Data de nascimento: __/__/__ Naturalidade: _____ Etnia: _____
Unidade(ambulatório de acompanhamento): _____	
Prontuário HU : _____	Prontuário CEROF : _____
Telefone : _____	
Endereço: _____	

DADOS SÓCIODEMOGRÁFICOS

- Estado civil:
 - () casado (a) () desquitado(a)/ separado
 - () viúvo (a) () solteiro (a) () outros
- Ocupação:
 - () trabalha () aposentado
 - () do lar () outra: _____
- Número de membros da Família (residência): _____
- Escolaridade: _____

**DADOS REFERENTES AO
DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E
CONTROLE DO DIABETES E OUTRAS
COMORBIDADES**

Tempo de Diagnóstico da Diabetes: _____

Tempo de Diagnóstico da RD: _____

Casos de DM na família:

() sim () não () Não sabe

Fatores de risco para complicações vasculares:

S () N () tabagismo

S () N () etilismo

S () N () sedentarismo

S () N () HAS há _____ anos

S () N () depressão

• Tratamento realizado:

() dieta () dieta e antidiabético oral

() dieta e insulina () dieta, antidiabético oral e insulina () outro

• Medicamentos que faz uso:

• Presença de complicações:

S () N () IAM- Infarto agudo do miocárdio

S () N () amputação de membro

S () N () pé diabético

S () N () AVE- Acidente vascular encefálico(derrame)

() Neuropatia () Nefropatia

• Qual a Frequência que você faz uma consulta médica?

() 2 ou mais vezes por mês

() 1 vez por mês

() a cada 2(dois) meses

() a cada 3 (três) meses

() a cada 6 meses

() 1 vez por ano

EXAMES LABORATORIAIS

HbA1c _____ Glicemia de jejum _____

Colesterol total _____ Colesterol HDL _____

Colesterol LDL _____ Triglicerídeos _____

Creatinina _____ CAT/MDA _____

DADOS DA AVALIAÇÃO CLÍNICA

• Oftalmologia

() S/RD () RDNP leve

() RDNP moderada () RDNP severa

() RDP () EMD (edema macular diabético)

Que tipo de tratamento vem sendo realizado para RD ? _____

• Pressão arterial :

P.A. Sistólica: _____ P.A. Diastólica: _____

AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA:

Peso Atual(Kg)	Estatura(cm):	IMC(Kg/m²) Estado Nutricional:
CIRCUNFERÊNCIAS		
Cintura(cm):	Quadril(cm):	Relação C/Q: Resultado:
DOBRAS CUTÂNEAS (Referência DURNIN E WOMERSLEY, 1974)		
Tricipital(mm):	Bicipital(mm):	
Subscapular(mm):	Suprailíaca(mm):	
Percentual de gordura (%)		

• ANEXO E – IPAQ VERSÃO CURTA



**QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA –
VERSÃO CURTA -**

Nome: _____
Data: ____ / ____ / ____ Idade : ____ Sexo: F () M ()

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. Este projeto faz parte de um grande estudo que está sendo feito em diferentes países ao redor do mundo. Suas respostas nos ajudarão a entender que tão ativos nós somos em relação à pessoas de outros países. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na **ÚLTIMA** semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são **MUITO** importantes. Por favor responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação !

Para responder as questões lembre que:

- atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal
- atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez.

1a Em quantos dias da última semana você **CAMINHOU** por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

dias ____ por **SEMANA** () Nenhum

1b Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**?

horas: ____ Minutos: ____

2a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar

CENTRO COORDENADOR DO IPAQ NO BRASIL- CELAFISCS -
INFORMAÇÕES ANÁLISE, CLASSIFICAÇÃO E COMPARAÇÃO DE RESULTADOS NO BRASIL
Tel-Fax: – 011-42298980 ou 42299643. E-mail: celafiscs@celafiscs.com.br
Home Page: www.celafiscs.com.br IPAQ Internacional: www.ipaq.ki.se

moderadamente sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

2b. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?

horas: _____ Minutos: _____

3a Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

3b Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?

horas: _____ Minutos: _____

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentando durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

4a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?
_____ horas _____ minutos

4b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana**?
_____ horas _____ minutos

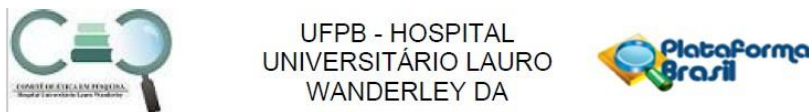
PERGUNTA SOMENTE PARA O ESTADO DE SÃO PAULO

5. Você já ouviu falar do Programa Agita São Paulo? () Sim () Não

6.. Você sabe o objetivo do Programa? () Sim () Não

CENTRO COORDENADOR DO IPAQ NO BRASIL- CELAFISCS -
INFORMAÇÕES ANÁLISE, CLASSIFICAÇÃO E COMPARAÇÃO DE RESULTADOS NO BRASIL
Tel-Fax: – 011-42298980 ou 42299643. E-mail: celafiscs@celafiscs.com.br
Home Page: www.celafiscs.com.br IPAQ Internacional: www.ipaq.ki.se

ANEXO E – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Epigenética + genética: identificação de marcadores para Retinopatia Diabética

Pesquisador: Darlene Camati Persuhn

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

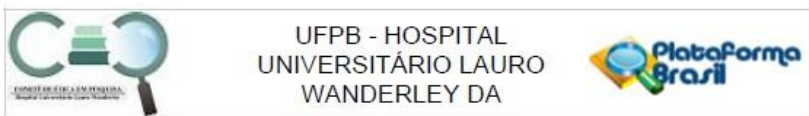
CAAE: 99840118.3.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA DO ESTADO DA PARAIBA - FAPES
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.053.068



Continuação do Parecer: 3.053.068

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

JOAO PESSOA, 03 de Dezembro de 2018

Assinado por:
MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE
(Coordenador(a))