

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE  
LISBOA

**A metabolómica e os novos biomarcadores  
clínicos da diabetes tipo 2: Revisão sistemática  
e meta-análise**

Autora:

Alda Regina Zacarias de Jesus

Orientadoras:

Professora Doutora Luísa Veiga (ESTeSL)

Professora Doutora Carina Silva (ESTeSL)

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa, 2022



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE  
LISBOA

**A metabolómica e os novos biomarcadores  
clínicos da diabetes tipo 2: Revisão sistemática  
e meta-análise**

Autora:

Alda Regina Zacarias de Jesus

Júri:

Professora Doutora Maria Helena Soares

Professora Doutora Ana Brito Pereira

Professor Doutor José Silva Nunes

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa, 2022



# **A metabolómica e os novos biomarcadores clínicos da diabetes tipo 2: Revisão sistemática e meta-análise**

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Dissertação submetida para obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Moleculares em Saúde

A Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa tem o direito de arquivar e publicar esta dissertação de mestrado, através de exemplares impressos ou de forma digital e de a divulgar através de repositórios científicos e admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e que tal não viole nenhuma restrição imposta por artigos publicados que nela tenham sido incluídos.

“O hábito da ação, acredito ser esse o hábito mais importante a ser adquirido.”

Shinichi Suzuki

## **Agradecimentos e dedicatória**

Agradeço ao João por me apoiar neste percurso sabendo que iria abdicar de muitos momentos em conjunto em prol da minha frequência no Mestrado.

Agradeço a todos os Excelentíssimos Professores Doutores que integram o Mestrado de Tecnologias Moleculares em Saúde, lecionado na Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL) pela oportunidade de partilha de conhecimento, pelos desafios colocados, por todos os momentos que permitiram e que me proporcionaram expandir intelectualmente. Obrigada pela dedicação e empenho nesta época de pandemia que obrigou a todos, de forma inesperada, a se reinventar e, a vós, reinventar o método de ensino. Obrigada por continuarem e assegurarem que corria tudo bem.

Agradeço especialmente à Excelentíssima Professora Doutora Luísa Veiga pela originalidade do tema deste trabalho, pela orientação no decurso do mesmo e pela dedicação.

Um grande agradecimento à Excelentíssima Professora Doutora Carina Silva pela dedicação, pelo empenho e apoio que sempre prestou.

Agradeço aos meus pais que sempre me encorajaram a apostar na minha formação e me deram força sempre que precisei.

Dedico o meu trabalho aos meus queridos e estimados avós.

## Resumo

**Introdução:** A Diabetes *mellitus* tipo 2 (DT2) é uma doença de caráter epidémico. Na Europa, em 2021, existiam aproximadamente 61 milhões de pessoas com esta patologia. A doença geralmente acarreta complicações microvasculares e macrovasculares sendo a doença cardiovascular a principal causa de mortalidade. Estas complicações evoluem de forma silenciosa e muitas vezes já estão instaladas aquando do diagnóstico da DT2, pelo que um diagnóstico precoce é essencial. Neste âmbito, as tecnologias emergentes na área da metabolómica poderão contribuir para identificar novos biomarcadores da doença.

**Objetivos:** Este trabalho tem como principal objetivo a análise de estudos de metabolómica em DT2 com o intuito de sistematizar os biomarcadores da doença e de risco para desenvolver complicações associadas à DT2.

**Métodos:** Este estudo é de caráter secundário, de recuperação e análise da literatura. A pesquisa ocorreu de novembro de 2020 a fevereiro de 2021 na *MEDLINE* e *EMBASE*. Após a análise dos artigos e da recolha dos dados procedeu-se à meta-análise. O *effect size* considerado para a construção dos *forest plots* foi o *Odds Ratio* e respetivos intervalos de confiança a 95%. O modelo de efeito aleatório aplicado à construção dos *forest plots* teve por base a estatística  $I^2$  e o teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

**Resultados:** As concentrações dos metabolitos valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, glicina e glicerol encontram-se aumentadas sugerindo um risco mais elevado de desenvolver a doença. Por sua vez, a alanina e a lisina apresentam valores mais baixos e parecem representar um fator protetor. Na DT2 associada a complicações todos os metabolitos estudados mostraram alterações semelhantes aos encontrados para a doença sem complicações exceto a tirosina que se encontra diminuída.

Estes resultados foram significativos para alanina, glicina e leucina ( $p < 0.001$ ) na DT2.

**Conclusões:** Os resultados obtidos apontam para que a leucina, glicina e alanina possam ser considerados como eventuais biomarcadores da DT2. Contudo, outros estudos primários são necessários para aumentar os conhecimentos nesta área.

### Palavras - chave

Diabetes *Mellitus* tipo 2, Metabolómica, Biomarcadores, Meta-análise

## Abstract

**Introduction:**Type 2 diabetes mellitus (T2D) is an epidemic disease. In Europe, in 2021, there were approximately 61 million people with this pathology. The disease usually causes microvascular and macrovascular complications, with cardiovascular disease being the main cause of mortality. These complications evolve silently and are often already installed when T2D is diagnosed, so an early diagnosis is essential. In this context, emerging technologies in the field of metabolomics may help to identify new biomarkers of the disease.

**Objectives:**The main objective of this work is the analysis of metabolomics studies in T2D in order to systematize the disease and risk biomarkers for developing complications associated with T2D.

**Methods:** This study is of a secondary nature, retrieving and analyzing the literature. The survey took place from November 2020 to February 2021 on MEDLINE and EMBASE. After analyzing the articles and collecting the data, the meta-analysis was carried out. The effect size considered for the construction of the forest plots was the Odds Ratio and respective 95% confidence intervals. The random effect model applied to the construction of the forest plots was based on the I<sup>2</sup> statistic and the Chi-square test ( $\chi^2$ ).

**Results:** The concentrations of the metabolites valine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, glycine and glycerol are increased, suggesting a higher risk of developing the disease. In turn, alanine and lysine have lower values and seem to represent a protective factor. In T2D associated with complications, all metabolites studied showed changes similar to those found for uncomplicated disease, except for tyrosine, which is decreased.

These results were significant for alanine, glycine and leucine ( $p < 0.001$ ) in DT2.

**Conclusions:** The results obtained indicate that leucine, glycine and alanine can be considered as possible biomarkers of T2D. However, other primary studies are needed to increase knowledge in this area.

### Key words

Type 2 diabetes mellitus, Metabolomics, Biomarkers, Meta-analysis

# Índice geral

<b>Índice de figuras</b>	<b>xiii</b>
<b>Índice de gráficos</b>	<b>xiv</b>
<b>Índice de tabelas</b>	<b>xvi</b>
<b>Índice de apêndices</b>	<b>xvii</b>
<b>Lista de abreviaturas, acrônimos e siglas</b>	<b>xviii</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Pertinência do Estudo	1
1.2. Revisão sistemática e meta-análise	2
1.3. Objetivos	2
<b>2. Enquadramento Teórico</b>	<b>3</b>
2.1. Epidemiologia	3
2.2. A Diabetes	4
2.3. Fatores de risco para a DT2	5
2.4. Fisiopatologia	5
2.4.1 A Célula $\beta$	6
2.4.2. Disfunção da Célula $\beta$	6
2.4.3. Resistência à insulina	7
2.5. Complicações associadas à DT2	8
2.6. Diagnóstico	9
2.7. Os novos biomarcadores para a DT2	9
2.8. Metabolómica	10
2.9. Estratégias untarget e target	10
2.10. Métodos analíticos em metabolómica	11
2.10.1. Espectrometria de massa (MS)	11
2.10.2. Ressonância magnética nuclear (NMR)	11
2.10.3. Vantagens e limitações	12
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>13</b>
3.1. Protocolo	13
3.2. Critérios de inclusão e exclusão	13
3.2.1. Participantes	13
3.2.2. Intervenção	14
3.2.3. Comparação	14
3.2.4. Outcome	15
3.3. Estratégia de pesquisa sistemática	15

3.3.1. Bases de dados pesquisadas	15
3.3.2. Termos de pesquisa	16
3.3.3. Screening inicial dos estudos	16
3.4. Extração de dados para a revisão sistemática e meta-análise	16
3.5. Meta-análise	17
<b>4. Resultados</b>	<b>19</b>
4.1. Outcome da pesquisa sistemática da literatura	19
4.2. Características dos estudos seleccionados	21
4.2.1. Artigos científicos e tipo de estudos	21
4.2.2. População dos estudos seleccionados	22
4.2.3. Tipos de amostras e abordagem metabólica	22
4.3. Avaliação da qualidade dos estudos	24
4.4. Outcome dos estudos elegíveis	25
4.5. Metabolitos referenciados nos estudos	25
4.5.1. Número de metabolitos referenciados	25
4.5.2. Análise qualitativa dos metabolitos referenciados	26
4.6. Meta-análise	29
4.6.1 Metabolitos associados à DT2	29
• Valina	30
• Fenilalanina	31
• Tirosina	32
• Interpretação de resultados: valina, fenilalanina e tirosina	33
• Isoleucina	33
• Interpretação de resultados: isoleucina	34
• Leucina	35
• Interpretação de resultados: leucina	36
• Alanina	36
• Interpretação de resultados: alanina	37
• Glicina	38
• Interpretação de resultados: glicina	39
• Glicerol	39
• Interpretação de resultados: glicerol	40
• Lisina	41
• Interpretação de resultados: lisina	42
4.6.2. Metabolitos associados à DT2 com complicações	42
• Valina	43

• Isoleucina	44
• Fenilalanina	45
• Leucina	46
• Interpretação de resultados: valina, isoleucina, fenilalanina e leucina	47
• Tirosina	47
• Interpretação dos resultados: tirosina e alanina	49
<b>5. Discussão</b>	<b>50</b>
5.1. Outcomes dos metabolitos analisados	50
5.1.1. Diabetes tipo 2 versus controlo	50
5.1.2. Diabetes tipo 2 com complicações versus diabetes tipo 2	51
5.2. Racional	53
5.3. Limitações	56
<b>6. Conclusões</b>	<b>57</b>
<b>7. Referências bibliográficas</b>	<b>59</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Diabetes no mundo em 2021	4
Figura 2. Fluxograma	20
Figura 3. Proveniência da população dos estudos incluídos	22

## Índice de gráficos

Gráfico 1. Número de entradas	15
Gráfico 2. Ano de publicação dos artigos seleccionados	21
Gráfico 3. Distribuição do tipo de estudos dos artigos seleccionados	21
Gráfico 4. Distribuição do tipo de amostras estratégia e técnica	23
Gráfico 5. Avaliação da qualidade dos estudos	24
Gráfico 6. <i>Outcome</i>	25
Gráfico 7. Número de metabolitos por estudo	26
Gráfico 8. Número de vezes que um metabolito é reportado	27
Gráfico 9. <i>Forest plot</i> valina - DT2 vs Controlo	30
Gráfico 10. <i>Funnel plot</i> valina - DT2 vs Controlo	30
Gráfico 11. <i>Forest plot</i> fenilalanina - DT2 vs Controlo	31
Gráfico 12. <i>Funnel plot</i> fenilalanina - DT2 vs Controlo	31
Gráfico 13. <i>Forest plot</i> tirosina - DT2 vs Controlo	32
Gráfico 14. <i>Funnel plot</i> tirosina - DT2 vs Controlo	32
Gráfico 15. <i>Forest plot</i> isoleucina - DT2 vs Controlo	33
Gráfico 16. <i>Funnel plot</i> isoleucina - DT2 vs Controlo	34
Gráfico 17. <i>Forest plot</i> leucina - DT2 vs Controlo	35
Gráfico 18. <i>Funnel plot</i> leucina - DT2 vs Controlo	35
Gráfico 19. <i>Forest plot</i> alanina - DT2 vs Controlo	36
Gráfico 20. <i>Funnel plot</i> alanina - DT2 vs Controlo	37
Gráfico 21. <i>Forest plot</i> glicina - DT2 vs Controlo	38
Gráfico 22. <i>Funnel plot</i> glicina - DT2 vs Controlo	38
Gráfico 23. <i>Forest plot</i> glicerol - DT2 vs Controlo	39
Gráfico 24. <i>Funnel plot</i> glicerol - DT2 vs Controlo	40
Gráfico 25. <i>Forest plot</i> lisina - DT2 vs Controlo	41
Gráfico 26. <i>Funnel plot</i> lisina - DT2 vs Controlo	41

Gráfico 27. <i>Forest plot</i> valina - DT2 vs DT2 com complicações	43
Gráfico 28. <i>Funnel plot</i> valina - DT2 vs DT2 com complicações	43
Gráfico 29. <i>Forest plot</i> isoleucina - DT2 vs DT2 com complicações	44
Gráfico 30. <i>Funnel plot</i> isoleucina - DT2 vs DT2 com complicações	44
Gráfico 31. <i>Forest plot</i> fenilalanina - DT2 vs DT2 com complicações	45
Gráfico 32. <i>Funnel plot</i> fenilalanina - DT2 vs DT2 com complicações	45
Gráfico 33. <i>Forest plot</i> leucina - DT2 vs DT2 com complicações	46
Gráfico 34. <i>Funnel plot</i> leucina - DT2 vs DT2 com complicações	46
Gráfico 35. <i>Forest plot</i> tirosina - DT2 vs DT2 com complicações	47
Gráfico 36. <i>Funnel plot</i> tirosina - DT2 vs DT2 com complicações	48
Gráfico 37. <i>Forest plot</i> alanina - DT2 vs DT2 com complicações	48
Gráfico 38. <i>Funnel plot</i> alanina- DT2 vs DT2 com complicações	49

## Índice de tabelas

Tabela 1. Vantagens e limitações dos métodos de MS e NMR	12
Tabela 2. Variação dos metabolitos entre grupos	28

## Índice de apêndices

Apêndice I. Protocolo	70
Apêndice II. Artigos incluídos no estudo	76
Apêndice III. Dados para meta-análise	91
Apêndice IV. Qualidade dos estudos incluídos	99

## Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas

**ADP:** Adenosina difosfato, do inglês *Adenosine diphosphate*

**ATP:** Adenosina trifosfato, do inglês *Adenosine triphosphate*

**BCAA:** Aminoácidos de cadeia ramificada, do inglês *Branched chain amino acids*

**CASP:** *Critical Appraisal Skills Programme*

**Da:** Dalton

**DCV:** Doença cardiovascular

**DGS:** Direção Geral de Saúde

**DM:** *Diabetes Mellitus*

**DT2:** *Diabetes Mellitus* tipo 2

**GC-MS:** Cromatografia gasosa - Espectrometria de massa, do inglês *Gas Chromatography - Mass spectrometry*

**GWAS:** Genome-wide association study

**HR:** *Hazard ratio*

**IAPP:** Polipéptidos ilhota amilóide, do inglês *Islet amyloid polypeptide*

**IDF:** *International Diabetes Federation*

**IUPAC:** *International Union of Pure and Applied Chemistry*

**LC-MS:** Cromatografia líquida - Espectrometria de massa, do inglês *Liquid Chromatography - Mass spectrometry*

**LCR:** Líquido cefalorraquidiano

**NMR:** Ressonância magnética nuclear, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**OR:** *Odds ratio*

**P2X:** Purinoreceptor P2X

**P2Y:** Purinoreceptor P2Y

**PICO:** População, intervenção, comparação, *outcome*

**RCT:** *Random Clinical Trial*

**RYR:** Receptores de rianodina

**SERCA:** Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase

**UPR:** Proteína de resposta desdobrada, do inglês *unfolded protein response*

# 1.Introdução

Este capítulo inicia-se com uma breve alusão à pertinência do estudo onde é ressaltada a problemática da DT2 e do seu impacto na saúde global, a importância de um diagnóstico precoce e a mais valia que técnicas metabólicas apresentam neste campo. Depois segue-se a revisão sistemática e meta-análise de forma a elucidar quais as suas finalidades, por fim, são referidos os objetivos, geral e específicos, a que se propõe esta investigação.

## 1.1. Pertinência do Estudo

A diabetes é uma doença metabólica, crónica e epidémica. A *International Diabetes Federation (IDF)*, no seu atlas de 2021, refere que mundialmente 1 em cada 10 adultos tem diabetes.<sup>1</sup> Da totalidade dos casos de diabetes, mais de 95% correspondem à diabetes tipo 2 (DT2).<sup>2</sup>

A DT2 é uma patologia progressiva associada, em grande parte, ao estilo de vida moderno e à dieta.<sup>3</sup> Como é uma doença dinâmica, os doentes desenvolvem complicações macro e microvasculares carecendo de tratamento e acompanhamento.<sup>4</sup>

Geralmente, o diagnóstico da DT2 é tardio apresentando já o doente complicações associadas.<sup>3</sup> Por esta razão, a DT2 tem um grande impacto não só na saúde dos doentes mas também representa elevados custos económicos para o sector da saúde;<sup>5</sup> sendo essencial um diagnóstico precoce.

A metabolómica, bem como as outras ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica, e lipidómica), tem permitido o estudo dos componentes das células, dos tecidos e a identificação de moléculas associadas ao desenvolvimento desta patologia. Os avanços conseguidos nestas áreas fornecem não só um melhor entendimento ao nível dos mecanismos que estão envolvidos na etiologia da DT2, mas também a possibilidade de identificar biomarcadores da doença, e compreender as vias metabólicas comprometidas.<sup>3,6</sup> Apesar das várias estratégias implementadas para a prevenção desta patologia, a sua prevalência continua a aumentar,<sup>3</sup> tornando-se necessário encontrar novas abordagens de intervenção.

## 1.2. Revisão sistemática e meta-análise

A revisão sistemática surge na década de 1990 pela necessidade de assegurar que as decisões tomadas sobre a vida das pessoas, nomeadamente na área da saúde, eram baseadas na compreensão atualizada e completa das evidências relevantes sobre determinada pesquisa.<sup>7</sup>

Até então, estas decisões eram baseadas em revisões narrativas. As revisões narrativas combinam os dados de vários estudos que são selecionados e analisados por um especialista da área que resume os resultados e emite uma conclusão. Porém, todo o processo é subjetivo, dependendo do que o especialista acha ou não relevante para a pesquisa. Outra limitação que a narrativa descritiva apresenta é que se torna menos profícua à medida que novos dados surgem.<sup>7</sup> Por outro lado, a revisão sistemática obedece a uma metodologia estruturada, transparente e replicável. A questão de investigação é estabelecida à priori bem como os objetivos da revisão e quais os estudos elegíveis para inclusão. Os métodos aplicados são explícitos e sistemáticos com o intuito de minimizar o viés, a fim de alcançar resultados mais confiáveis. Ainda assim, existe alguma subjetividade tanto nos critérios definidos para inclusão ou exclusão dos estudos como nas conclusões extraídas na meta-análise, no entanto, todo o processo é devidamente documentado e transparente.

A meta-análise tem como finalidade sintetizar as estatísticas dos resultados provenientes de uma série de estudos. No entanto, a síntese só é válida se a seleção dos estudos decorrer de forma sistemática.<sup>8</sup> Desta forma faz todo o sentido que a meta-análise decorra após uma revisão sistemática.

## 1.3. Objetivos

Esta investigação tem como objetivo geral analisar os resultados de estudos de metabóloma em indivíduos com diabetes tipo 2 e sistematizar os biomarcadores da doença. Os objetivos específicos:

- a) Sistematizar os metabolitos alterados na DT2;
- b) Sistematizar metabolitos de risco para o desenvolvimento de complicações associadas à DT2;
- c) Identificar possíveis biomarcadores da DT2 e complicações tardias da doença.

Para a identificação destes biomarcadores recorreu-se a uma revisão sistemática e meta-análise.

## 2. Enquadramento Teórico

Este capítulo tem início com uma visão geral sobre a epidemiologia da diabetes. Posteriormente descreve-se em traços gerais a DT2 e o impacto que tem na vida dos doentes; fatores de risco associados e a fisiopatologia da doença. É descrito a célula beta pancreática e a sua disfunção, assim com a resistência à insulina. Seguidamente aborda-se o diagnóstico da DT2 e as complicações tardias desta patologia. Por fim, com recurso à metabolómica, referem-se as necessidades de novos biomarcadores para o diagnóstico da DT2, mencionam-se as estratégias *target* e *untarget* bem como os métodos analíticos de espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear citando algumas vantagens e limitações destas metodologias.

### 2.1. Epidemiologia

A diabetes é considerada atualmente como um problema de saúde pública e de proporções epidémicas. Segundo a IDF, em 2021, 537 milhões de indivíduos com idades entre os 20 e 79 anos vivem com diabetes. Na Europa, estima-se que 61 milhões de pessoas tenha diabetes (Figura 1) e é expectável que este número aumente 13% (para 69 milhões) até 2045<sup>1,4</sup>

Portugal é um dos países da Europa com maior prevalência de diabetes com cerca de 13,6% da população afetada, entre os 20 e os 79 anos, segundo os últimos dados publicados pelo Observatório Nacional da Diabetes.<sup>9,10</sup>

A tendência ascendente da diabetes tipo 2 está intrinsecamente relacionada sobretudo com o aumento da obesidade, resultante de uma alimentação pouco saudável e de sedentarismo.<sup>11</sup>

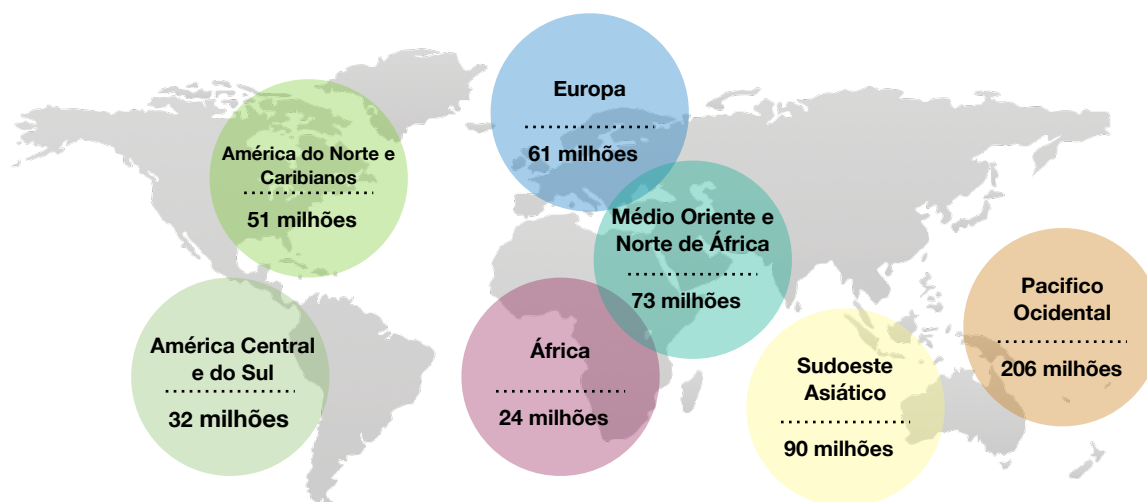


Figura 1. Diabetes no mundo em 2021. Imagem adaptada de IDF Diabetes Atlas.<sup>3</sup>

## 2.2. A Diabetes

A Diabetes *mellitus* tipo 2 é uma doença metabólica, crónica, que é caracterizada por níveis elevados de glucose no sangue (hiperglicemia) devido à deficiência relativa de insulina causada pela disfunção das células  $\beta$  pancreáticas e resistência à insulina das células alvo.<sup>13</sup>

De todos os tipos de diabetes, a DT2 é a mais comum.<sup>2,12,13</sup> A sintomatologia desta patologia é similar à Diabetes tipo 1 (são exemplos: poliúria, polidipsia, polifagia, fadiga, perda de peso, visão turva, cicatrização lenta) mas apresentada de forma mais ligeira.<sup>2</sup> Por esta razão, muitas vezes passa despercebida na sua fase inicial sendo diagnosticada num estadio mais avançado.<sup>14</sup>

Estes doentes têm um risco aumentado de desenvolver complicações macrovasculares, como a doença cardiovascular (DCV), principal causa de morbilidade e mortalidade associada à DT2<sup>13</sup> e complicações microvasculares, como nefropatia, neuropatia e retinopatia.<sup>14</sup>

Desta forma, os indivíduos com DT2 necessitam de um acompanhamento adequado e intensivo de forma a controlar a progressão da doença e das suas complicações.

Salienta-se que o tratamento das comorbidades representa uma importante fração dos custos no sector da saúde.<sup>15</sup> Por este motivo, é de grande interesse a prevenção, o tratamento e a monitorização adequada dos doentes, de forma a controlar a progressão e o agravamento do estado de saúde. Uma vez que se trata de uma patologia dinâmica que evolui ao longo dos anos e de forma diferente de indivíduo para indivíduo<sup>15,14</sup> a intervenção personalizada é crucial.

## 2.3. Fatores de risco para a DT2

Os promotores de risco advêm de uma complexa interação entre fatores genéticos, metabólicos e ambientais.<sup>18</sup>

A natureza poligênica da DT2 está evidenciada em vários “*Genome-wide association study*” (GWAS), que demonstram que o risco aumentado de desenvolver a doença está maioritariamente relacionado com perturbações na secreção de insulina e que apenas uma pequena minoria com a resistência da mesma.<sup>16</sup> Foram também identificados, por Dimas *et al.* padrões distintos de resistência à insulina confirmando a elevada complexidade poligênica.<sup>17</sup>

O sedentarismo bem como a obesidade, geralmente associada a anomalias metabólicas que levam à resistência à insulina, são outros dois fatores de risco importantes.<sup>11</sup>

Apesar dos fatores de risco não modificáveis, como a predisposição genética, etnia e história familiar, contribuírem para uma forte predisposição para desenvolver a doença, vários estudos epidemiológicos indicam que é possível prevenir, ou retardar o seu aparecimento, através de alterações dos fatores de risco modificáveis nomeadamente as escolhas alimentares saudáveis, atividade física e peso, vistos hoje em dia como os principais agentes de risco.<sup>18,19</sup>

## 2.4. Fisiopatologia

A DT2 surge de um desequilíbrio no metabolismo da glucose. Sendo este metabolismo normalmente regulado por um mecanismo de *feedback* entre as células  $\beta$  dos ilhéus pancreáticos e os tecidos alvo à insulina.<sup>20</sup> Estes tecidos influenciam a produção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas. A estimulação das células  $\beta$  leva à produção de insulina que medeia a captação de glucose, aminoácidos e ácidos gordos pelos tecidos sensíveis à insulina. Por sua vez, estes tecidos fornecem informação às células  $\beta$  sobre as suas necessidades de insulina.<sup>21</sup>

Quando há resistência à insulina, habitual em pessoas com obesidade, os níveis de produção de glucose no fígado aumentam enquanto que os níveis de captação da mesma molécula pelo músculo, fígado e tecido adiposo diminuem. Por outro lado, a disfunção das células  $\beta$  leva à diminuição da sua atividade traduzindo-se na diminuição da libertação de insulina.

Qualquer um destes cenários pode ocorrer na patogénese da DT2. Contudo, quando estas condições se manifestam conjuntamente, a hiperglicemia é mais acentuada correspondendo geralmente a uma fase mais avançada da doença.<sup>20-22</sup>

## 2.4.1 A Célula $\beta$

As células  $\beta$  tem como função primordial a síntese de insulina, que, na sua forma mais imatura é designada de pré-pró-insulina.<sup>22</sup> Mais tarde, no processo de maturação, auxiliada por várias proteínas do retículo endoplasmático (RE), esta sofre uma alteração conformacional dando origem à pró-insulina.<sup>22,23</sup> A pró-insulina é translocada para o aparelho de Golgi onde vesículas secretoras imaturas clivam a pró-insulina em péptido-C e insulina. Esta fica armazenada em grânulos até ser necessária a sua libertação, geralmente estimulada pelo aumento da concentração de glucose circulante.

Quando se verifica um aumento da glicemia, esta é absorvida pelas células  $\beta$  por intermédio de uma proteína transmembranar que facilita o transporte de **e - 2 (GLUT2)**.<sup>24</sup> Após a entrada da glucose na célula, o catabolismo da glucose é iniciado levando ao aumento da relação ATP/ADP no interior da célula. Este aumento leva ao fecho de canais de potássio ATP-dependentes na membrana plasmática. Consequentemente ocorre a despolarização da membrana e abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem levando à entrada deste ião na célula. O aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, desencadeia a fusão dos grânulos secretores que contêm insulina com a membrana plasmática, levando à sua libertação.<sup>25</sup>

Os sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares podem ser amplificados por diversos mecanismos incluindo moléculas mensageiras geradas a partir do metabolismo de nutrientes. A libertação de insulina pode ser estimulada não só pelo aumento das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mas também pelo cAMP.<sup>25,26</sup> Existem evidências que o cAMP promove a mobilização de vesículas secretoras que contêm insulina através do consumo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.<sup>26</sup> Existem outras proteínas transmembranares que contribuem para a mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  como P2X, P2Y, SERCA e RYR.<sup>27,28</sup>

## 2.4.2. Disfunção da Célula $\beta$

A disfunção das células  $\beta$  na DT2 assenta numa complexa interação entre o ambiente e diferentes vias de sinalização da célula.<sup>29</sup>

À semelhança do que ocorre na obesidade, um aporte calórico excessivo condiciona o aparecimento de hiperglicemia e hiperlipidemia, favorecendo a resistência à insulina e à inflamação crónica.<sup>30</sup>

Estes fatores colocam as células  $\beta$  sob situações de *stress* inflamatório, oxidativo e metabólico. O *stress* do RE é o principal responsável pela morte das células  $\beta$  pancreáticas.<sup>30</sup>

O excesso de ácidos gordos livres leva à disfunção das células  $\beta$  pela ativação da via de sinalização UPR (*unfolded protein response*).<sup>31</sup> A ativação desta via pode ser feita de várias formas quer pela inibição da SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase*),

que tem por função o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol para o retículo sarcoplasmático, *stress* do RE ou pela ativação de recetores IP3.<sup>23</sup>

Por outro lado, a glucotoxicidade estimula a produção de pró-insulina e amilina ou polipéptidos ilhota amilóide (IAPP) nas células  $\beta$  resultando numa acumulação de insulina e amilina mal dobradas conjuntamente com o aumento de espécies reativas de oxigénio.<sup>23</sup> Estes eventos levam à alteração da mobilização normal do  $\text{Ca}^{2+}$  no RE, estimulam sinais que favorecem a apoptose, degradação de mRNA de pró-insulina e estimulam a libertação da (IL)-1  $\beta$  que atrai macrófagos e aumenta a inflamação no local.<sup>32</sup>

Alterações nos processos de síntese dos precursores de insulina ou da própria hormona, assim como alterações na sua secreção, podem levar à disfunção secretora da insulina, a causa mais frequente da disfunção das células  $\beta$  na DT2.<sup>33</sup>

Como mencionado anteriormente, a secreção de insulina deve ser regulada com rigor para atender com precisão à demanda metabólica. Por essa razão, a integridade das ilhotas deve ser conservada para permitir que as células  $\beta$  respondam às necessidades metabólicas.<sup>33</sup>

### 2.4.3. Resistência à insulina

O corpo humano necessita constantemente de energia para o seu correto funcionamento, a qual advém da dieta que é essencialmente uma mistura de nutrientes ingeridos de forma pontual. Existem mecanismos de transporte, utilização e armazenamento quer de glícidos quer de lípidos para que a fonte de energia seja constante e não apenas dependente da ingestão da refeição.<sup>34</sup>

A maioria dos tecidos tem a habilidade de alternar a sua fonte de energia entre o estado de jejum (lípidos) e pós-prandial (glícidos), regulada pelo glucagon e pela insulina, respetivamente.<sup>34,35</sup> A resistência à insulina é o traço principal da DT2 e precede o desenvolvimento clínico da doença entre uma a duas décadas.<sup>36</sup>

Existem três classes de resistência à insulina ou deficiência de insulina: (1) diminuição da produção de insulina no pâncreas, (2) presença de antagonistas de insulina no plasma, devido a hormonas contra-regulatórias ou a substâncias não hormonais que afetam os recetores de insulina, ou modificam a eficácia da sinalização da insulina; (3) deficiente resposta do tecido alvo<sup>36</sup> ao não responder à ação da insulina como resultado de anomalias nos recetores de insulina ou nos sistemas efetores. Esta última causa de resistência à insulina é a mais comum nos indivíduos com DT2.<sup>37</sup>

A ação da insulina é influenciada pela interação com outras moléculas, como hormonas de crescimento (GH, do inglês *growth hormone*) ou fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1, *Insulin-like growth factor 1*) no estado pós-prandial e glucagon, glucocorticoides e catecolaminas no estado de jejum, de modo a prevenir hipoglicemia induzida pela insulina.<sup>38</sup> A relação proporcional insulina/glucagon tem um papel importante uma vez que determina o grau relativo de fosforilação de enzimas a jusante nas vias de

sinalização reguladoras. Os glucocorticoides promovem o catabolismo muscular, a gliconeogénese e a lipólise ao passo que as catecolaminas promovem a lipólise e a glicogenólise. Apesar da secreção descontrolada destas hormonas poder contribuir para a resistência à insulina, não é a responsável pela maioria dos estados de resistência à insulina.<sup>38</sup>

## **2.5. Complicações associadas à DT2**

De acordo com a literatura, podemos dividir as complicações da diabetes tipo 2 entre complicações agudas e complicações tardias.

Entre as complicações agudas encontram-se a cetoacidose diabética, hipoglicemia e síndrome hiperosmolar, enquanto as complicações tardias da diabetes dividem-se em: macrovasculares, (em que há afeção de grandes territórios vasculares como as artérias cerebrais, miocárdicas e dos membros inferiores) e microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia diabéticas).

As complicações tardias mais prevalentes incluem a doença cardiovascular, acidentes vasculares-cerebrais, doença arterial periférica, retinopatia diabética, neuropatia diabética, neoplasias, entre outras.<sup>39</sup> Entre elas, a doença cardiovascular é sem dúvida a mais relevante, nomeadamente a doença arterial coronária, pois não só atinge 55% destes doentes, como é a principal causa de morte nesta população.<sup>40</sup>

Os mecanismos fisiopatológicos das complicações da DT2 são complexos e multifatoriais mas é provável que na sua origem estejam alterações micro ou macrovasculares, causadas por resistência à insulina, adiposidade visceral e aumento da inflamação. Estas alterações por sua vez causam disfunção endotelial, alteração das lipoproteínas e da cascata da coagulação que, isoladamente ou quase sempre associadas, levam ao desenvolvimento da placa aterosclerótica - lesão vascular que está na origem de eventos trombo-embólicos característicos da DT2.<sup>41,42</sup>

A prevenção e o tratamento das complicações da DT2 passam pelo controlo farmacológico da hiperglicémia, hipertensão arterial e dislipidémia. Não menos importantes, as alterações do estilo de vida têm igualmente um papel fundamental no controlo das complicações da diabetes, entre elas a promoção de uma dieta saudável, exercício físico e cessação tabágica.<sup>43</sup>

## 2.6. Diagnóstico

Em Portugal o diagnóstico para a diabetes rege-se pela norma 002/2011 da Direção Geral de Saúde e é feito com base nos seguintes parâmetros e valores para plasma venoso na população geral: glicemia de jejum  $\geq 126$  mg/dl (ou  $\geq 7,0$  mmol/l); ou sintomas clássicos + glicemia ocasional  $\geq 200$  mg/dl (ou  $\geq 11,1$  mmol/l); ou glicemia  $\geq 200$  mg/dl (ou  $\geq 11,1$  mmol/l) às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75g de glicose; ou hemoglobina glicada A1c (HbA<sub>1c</sub>)  $\geq 6,5\%$ .<sup>44</sup> A HbA<sub>1c</sub> informa sobre os níveis de glicose dois a três meses antes do teste, informando de um valor médio em vez de um valor num determinado momento sendo uma das mais valias do teste.<sup>14,45</sup>

Apesar de tudo, estes testes apresentam algumas desvantagens ou porque são inconvenientes para o doente, como é o caso do teste da medição da concentração da glicose em jejum, ou porque não estão indicados em alguns quadros clínicos, como é o caso do teste da HbA<sub>1c</sub> em doentes com insuficiência renal, em tratamento para HIV, doenças que afetam os eritrócitos ou o diagnóstico para a diabetes gestacional; que podem levar a leituras incorretas, sendo controversa a relevância do teste. Os testes são aplicados em doentes sintomáticos ou assintomáticos que tenham sido identificados como de risco. No entanto, aproximadamente 40% dos casos de DT2 não chegam a ser diagnosticados.<sup>10,45</sup>

## 2.7. Os novos biomarcadores para a DT2

A elevada prevalência da diabetes tipo 2 e das suas complicações, nomeadamente a DCV, têm um grande impacto na saúde global.<sup>41,42</sup> Apesar das estratégias eficazes na prevenção e tratamento da doença, não se verificam grandes avanços no diagnóstico precoce, nem no tratamento e controlo global da DT2.<sup>43</sup> É imperativo que haja uma melhor compreensão sobre os distúrbios metabólicos que levam a esta doença.<sup>43</sup> Como a DT2 se desenvolve muito antes de ser passível de ser detetada pelos testes convencionais, a metabolómica assume um papel preponderante no diagnóstico precoce, pois consegue identificar metabolitos circulantes associados à DT2 mais de uma década antes da manifestação da doença. Estes metabolitos funcionam como biomarcadores preditivos da DT2 aumentando a eficácia no diagnóstico.<sup>45</sup> Os biomarcadores podem também fornecer informações importantes sobre o prognóstico, progressão ou desenvolvimento de complicações, assim como a resposta do organismo à terapêutica aplicada.

Um biomarcador é uma característica mensurável que serve como indicador sobre processos fisiológicos, patológicos ou sobre respostas a uma determinada exposição ou intervenção. Existem vários tipos de biomarcadores que são definidos consoante as suas aplicações, por exemplo, biomarcadores de diagnóstico, de monitorização, de resposta farmacodinâmica, etc. Um biomarcador deve ser passível de medição com precisão, confiável e reproduzível.<sup>46,47</sup>

## 2.8. Metabolómica

O termo “metaboloma” foi utilizado a primeira vez em 1998 por Steve Oliver *et al.* em *Systematic functional analysis of the yeast genome*, onde refere a necessidade de medir a variação da concentração relativa dos metabolitos como produto da expressão génica.<sup>48</sup>

A metabolómica é o estudo quantitativo e em larga escala de pequenas moléculas designadas de metabolitos, presentes numa célula, tecido, fluido biológico ou órgão. As interações dos metabolitos num sistema biológico constitui o metaboloma. A metabolómica tem por objetivo medir as concentrações dos metabolitos presentes numa determinada amostra biológica permitindo estudar os processos químicos envolvidos no metabolismo de forma sistemática.<sup>49</sup> Os metabolitos são moléculas de dimensões reduzidas (50 - 1500 Da), como por exemplo, glícidos, aminoácidos, ácidos gordos, etc., que intervêm em processos metabólicos ou são o produto desses processos. São ótimos biomarcadores porque geralmente o aumento ou o decréscimo da sua concentração relativa pode ser indício da presença de uma dada patologia. O estudo metabolómico da DT2 é pertinente uma vez que esta é uma doença metabólica poligénica que é moldada por fatores modificáveis.

No decorrer da última década tem-se verificado um aumento significativo de estudos metabolómicos nesta área, recorrendo a estratégias diferentes (*target* ou *untarget*) bem como o recurso a plataformas analíticas como a espectrometria de massa (MS) acoplada a cromatografia líquida (LC) ou gasosa (GC) ou como a ressonância magnética nuclear (NMR).<sup>59</sup>

## 2.9. Estratégias *untarget* e *target*

Uma estratégia *untarget* ou não dirigida, é uma análise global que tem por objetivo medir a maior quantidade de metabolitos presentes na amostra e permite a identificação de novos compostos. Este tipo de estratégia não pressupõe o conhecimento prévio do conteúdo da amostra biológica ou seja, o metaboloma é à partida desconhecido.

A principal vantagem é oferecer uma base imparcial para a análise da relação entre os metabolitos detetados pertencentes a diferentes vias metabólicas.<sup>50</sup>

Contudo, não é possível extrair todas as classes de metabolitos em simultâneo isto porque existem vários fatores que afetam a recuperação dos metabolitos como o pH, o solvente, o tipo de coluna e a técnica de ionização utilizada.<sup>58</sup>

Para proceder ao estudo metabolómico *untarget* é essencial ter um sistema analítico avançado e automatizado que permita o processamento dos dados obtidos. O sistema de tratamento de dados requer uma abordagem computacional que faça a correlação entre os dados brutos e o conhecimento biológico de forma significativa. Após a aquisição dos dados, é feito o seu *upload* para um *software* designado para o efeito, onde os dados são convertidos em matrizes para posterior análise estatística.<sup>49,40,51</sup>

A estratégia *target* ou dirigida mede as concentrações de um determinado conjunto de metabolitos preestabelecidos. O perfil metabolómico obtido advém da identificação e quantificação através da comparação do espectro de interesse com uma biblioteca de referência de compostos puros.<sup>52,53</sup>

A desvantagem que esta abordagem apresenta é o número reduzido de bibliotecas espectrais que permitem fazer a identificação e interpretação dos metabolitos.<sup>53</sup>

## 2.10. Métodos analíticos em metabolómica

### 2.10.1. Espectrometria de massa (MS)

A espectrometria de massa permite a identificação e quantificação de analitos com elevada resolução e sensibilidade. Genericamente, o processo envolve separação por cromatografia, ionização dos analitos e separação por massa.<sup>53</sup>

A cromatografia é muito útil em amostras pequenas, cujas concentrações dos analitos, são à partida, também reduzidas. Esta etapa reduz a supressão de iões, aumentando a precisão dos resultados. Na LC a separação dos analitos faz-se através da coluna de cromatografia, que possui uma fase estacionária que abriga inúmeras esferas revestidas com diferentes compostos químicos, ao fazer passar a fase móvel, onde os analitos se encontram dissolvidos, pela coluna de cromatografia, alguns destes vão interagir com os compostos da fase estacionária.<sup>52-54</sup> Esta afinidade entre os analitos e os compostos da fase estacionária permite que haja uma separação física.

No caso da CG os analitos são pulverizados numa fase gasosa, móvel, e passam por uma camada líquida adequada para moléculas de baixo peso molecular, voláteis e apolares. Após a separação dos analitos pela cromatografia estes entram no espectrómetro de massa onde ocorre a sua ionização através de *electrospray*.<sup>51</sup> A ionização tem por finalidade permitir que os analitos sejam acelerados por imanes em direção a um detetor a uma velocidade que é inversamente proporcional à razão massa/carga ( $m/z$ ). A quantificação ocorre no detetor através do número de impactos de cada ião.<sup>54,55</sup>

### 2.10.2. Ressonância magnética nuclear (NMR)

A ressonância magnética é a propriedade física exibida pelo núcleo atómico de determinados elementos quando submetidos a um forte campo magnético e excitados com radiofrequência.

A espectrometria por ressonância magnética nuclear baseia-se nesta característica dos núcleos atómicos, como é o caso do átomo de hidrogénio ( $^1\text{H}$ ), e nas propriedades do momento angular para identificar estruturas de compostos moleculares.<sup>47,56</sup>

A NMR tem a vantagem de ser uma metodologia não destrutiva que possibilita a identificação de compostos *in vivo*.<sup>57</sup> É a ferramenta mais direta e abrangente para estudar a

estrutura química de praticamente todas as moléculas orgânicas ou biológicas e de muitas moléculas inorgânicas podendo ser aplicada aos três estado de matéria. Este método é eficaz em amostras na ordem de grandeza dos microgramas ou abaixo e permite a identificação estrutural de compostos puros ou em misturas.

Para a identificação estrutural de uma molécula são necessários vários ensaios, de forma a deduzir a estrutura molecular através das propriedades magnéticas dos núcleos atômicos e dos elétrões circundantes.<sup>56,57</sup>

A limitação que a NMR apresenta tem a ver com os picos gerados que geralmente correspondem a uma integração de sinais de vários compostos diferentes pelo que a análise estatística dos dados é bastante complexa.<sup>58</sup>

### 2.10.3. Vantagens e limitações

A adequação do método analítico ao objetivo que se pretende alcançar deve ter em consideração alguns aspetos inerentes ao método e à amostra que se quer estudar. A tabela abaixo resume alguns das características da MS e NMR.

<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Limitações</b>
<b>MS</b>	Alta sensibilidade	Amostra exige alguma preparação
	Elevado número de metabolitos detetados	Dificuldade em distinguir isómeros
	Boa para análises <i>target</i>	
<b>NMR</b>	Elevada reprodutibilidade	Baixa sensibilidade
	Amostra exige pouca preparação	Não adequada para análises <i>target</i>
	Análise direta dos tecidos	
	Rápida - amostra pode ser analisada numa única medição	
	Não destrutiva	
	Fornecer informação estrutural detalhada (multi dimensional)	

**Tabela 1. Vantagens e limitações dos métodos de MS e NMR.** A tabela resume alguns pontos vantajosos de ambos os métodos bem como algumas das principais limitações.<sup>58</sup>

## 3. Materiais e Métodos

Este capítulo consiste nos materiais e métodos. Inicia-se com uma breve referência à elaboração do protocolo, seguindo-se da descrição dos critérios de inclusão e exclusão que contêm: participantes, intervenção, desenho do estudo e *outcome*. Inclui também uma descrição da estratégia de pesquisa onde refere as bases de dados pesquisadas, os termos utilizados na pesquisa, do *screening* inicial dos estudos e faz referência à extração dos dados para a revisão sistemática e meta-análise.

### 3.1. Protocolo

Foi elaborado um protocolo para a revisão sistemática e meta-análise. (ver apêndice I)

### 3.2. Critérios de inclusão e exclusão

O modelo *PICO* foi adotado para a elaboração da questão de investigação, assumindo-se da seguinte forma: população (P) indivíduos humanos adultos; intervenção (I) estudos com recurso a tecnologias metabólicas direcionadas à DT2 e às suas complicações; comparação (C) comparar indivíduos sem DT2 com DT2 e DT2 com DT2 com complicações e *outcome* (O) metabolitos associados à DT2 ou às complicações da DT2. Partindo da estrutura *PICO* as perguntas de pesquisa são:

- *Quais os metabolitos predominantemente alterados em indivíduos adultos com DT2?*
- *Quais os metabolitos predominantemente alterados em indivíduos com diabetes tipo 2 com complicações associadas?*

#### 3.2.1. Participantes

Foram incluídos estudos cujos participantes fossem homens ou mulheres com idade superior a 18 anos.

Segundo a OMS a maior taxa de incidência ocorre em indivíduos com idade superior a 25 anos, no entanto, vários autores alegam que as alterações metabólicas que precedem a DT2 ocorrem anos antes do diagnóstico da doença, pelo que se consideraram todos os indivíduos maiores de idade.

Do ponto de vista da etnia dos participantes não foi colocada nenhuma restrição pelo que todos os estudos foram considerados elegíveis sob este ponto de vista.

Foram excluídos estudos realizados em crianças, adolescentes, grávidas ou animais. Também foram excluídos estudos em indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 1 ou outro tipo de diabetes que não o tipo 2.

### 3.2.2. Intervenção

Foram incluídos estudos que recorressem a tecnologias metabolómicas, como é o caso da espectrometria de massa, acoplada a cromatografia líquida e/ou gasosa, ou da ressonância magnética nuclear; dirigidas à DT2 e à DT2 associada às complicações tardias decorrentes desta patologia. É do interesse deste estudo analisar exclusivamente metabolitos identificados pela metabolómica, uma vez que esta tecnologia permite ter uma visão abrangente dos componentes da célula e dos tecidos, permitindo estudar vias metabólicas/sinalização.

Foram considerados os tipos de estudos: *cohorts*; *case-cohort*, *case-control* e *clinical-trials*; em relação ao tempo de *follow-up* não foi considerado nenhuma restrição, pelo que se aceitaram quaisquer períodos de *follow-up*. Em contrapartida, foram rejeitadas revisões, comentários, editoriais ou cartas e publicações em duplicado.

Foi também equacionado o tipo de amostra utilizada para realizar o estudo metabolómico. Como o presente trabalho tem por objetivo identificar biomarcadores para o diagnóstico da DT2 e das suas complicações, decidiu-se incluir os estudos realizados em amostras de sangue (plasma ou soro) e urina, por serem estes o tipo de amostras mais utilizadas e indicadas para o diagnóstico desta patologia. Foram excluídos estudos realizados em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), humor vítreo ou tecidos biológicos (biópsia).

### 3.2.3. Comparação

Com o intuito de responder às questões de investigação, foram realizadas duas comparações:

- a) Indivíduos com diabetes tipo 2 com indivíduos sem diabetes (controlo);
- b) Indivíduos com diabetes tipo 2 sem complicações associadas com indivíduos com diabetes tipo 2 com complicações associadas.

### 3.2.4. Outcome

O primeiro *outcome* são os metabolitos associados à DT2 por forma a identificar potenciais biomarcadores para o diagnóstico precoce da doença. O segundo *outcome* esperado foram os metabolitos associados às complicações decorrentes da DT2. Com esta medida espera-se identificar biomarcadores com valor preditivo para o desenvolvimento ou não de complicações.

## 3.3. Estratégia de pesquisa sistemática

### 3.3.1. Bases de dados pesquisadas

Foi efectuada uma revisão sistemática da literatura publicada, nas bases de dados bibliográficas electrónicas *MEDLINE*, via *Pubmed* pelo acesso (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) versão 05/2020 (doravante referida como *Pubmed*), e *EMBASE*, via *Ovid*; (<https://ovidsp.ovid.com>) versão 2020, no período decorrido entre novembro de 2020 a fevereiro de 2021.

Como na última década têm surgido vários trabalhos no campo da metabolómica aplicada à DT2 (Gráfico 3.1), foi contemplado um período de 10 anos (2010 - 2020) como filtro de pesquisa.



**Gráfico 1. Número de entradas.** Entradas de artigos publicados na base de dados on-line *Pubmed* entre os anos 2002 e 2020.<sup>59</sup>

### 3.3.2. Termos de pesquisa

De modo a abranger o maior número possível de estudos na área, optou-se por utilizar palavras-chave mais gerais como metabólica, metaboloma e diabetes tipo 2. Em relação à data de publicação dos artigos optou-se por aplicar um filtro temporal de 10 anos (2010 a 2020) como justificado anteriormente.

Aferiram-se os termos de pesquisa para excluir estudos em diabetes tipo 1 ou gestacionais. Os resultados finais da pesquisa foram obtidos pela utilização dos seguintes termos com as respectivas partículas de articulação: “*type 2 diabetes AND ((metabolic) OR (metabolome)) NOT ((type 1 diabetes) OR (gestational diabetes))*”

Na base de dados *Embase* foram aplicados os mesmos princípios de pesquisa como explicado acima.

### 3.3.3. *Screening* inicial dos estudos

Os títulos e os resumos dos estudos foram lidos e analisados do modo a verificar se estavam de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos. Quando necessário, de forma a extrair a informação pretendida, o artigo foi lido na totalidade. Foi construído um fluxograma para descrever a informação através das diferentes fases da revisão sistemática, onde está demonstrado o número de registos identificados, incluídos e excluídos (ver secção 4.2 - fluxograma).

## 3.4. Extração de dados para a revisão sistemática e meta-análise

Todos os artigos considerados elegíveis e selecionados para o presente estudo foram minuciosamente analisados. Considerou-se fundamental extrair de cada artigo, quando possível, os autores, a revista e o ano de publicação, o tipo de estudo efetuado: *cohort*, *case-control*, *randomised controlled trial*, etc., as características da população tais como etnia, número de participantes (*N*) e a sua relação com a DT2 (não diabético, diabético ou diabético com complicações). Outros aspetos tidos em conta aquando da extração de dados foram: a técnica metabólica utilizada para alcançar os resultados demonstrados pelos autores, o tipo de amostra biológica sob a qual se fez a investigação, *outcome* e metabolitos encontrados. Em relação aos dados extraídos para a meta-análise consideraram-se os valores de *odds ratio* (OR), *p-value* e valores médios das concentrações relativas dos metabolitos na amostra.

Os dados extraídos foram anotados digitalmente numa tabela construída em *numbers* para o efeito (ver apêndice II).

Para a meta-análise fez-se uma contagem dos metabolitos anotados e aferiu-se o número de vezes mencionados pelos artigos.

Foram considerados para a meta-análise os metabolitos com maior número de referências.

O *cut-off* estipulado foi de pelos menos seis referências e que contivessem os dados

necessários para a meta-análise. Apesar de alguns metabolitos serem referidos pelos artigos várias vezes, nem todos eles apresentavam os elementos necessários para prosseguir com a meta-análise.

Depois de encontrados os metabolitos mencionados com maior frequência, foram construídas tabelas para cada um deles de forma a resumir a informação estritamente necessária para a meta-análise (ver apêndice III).

### 3.5. Meta-análise

A meta-análise combina os resultados dos diferentes estudos para obter uma estimativa global do efeito da intervenção, possibilitando a análise da heterogeneidade. O resultado final da meta-análise é sempre uma média ponderada das estimativas da medida de efeito dos diferentes estudos, neste caso em particular *Odds Ratio*. Em meta-análise são usados essencialmente dois tipos de modelos de regressão para estimar a medida de efeito resumo, o modelo de efeitos fixos e o modelo de efeitos aleatórios. No modelo de efeitos fixos assume-se que os estudos são homogêneos, isto é, a variabilidade observada entre os resultados dos estudos que compõem a meta-análise é devida apenas à variabilidade amostral interna de cada um dos estudos. Por sua vez, o modelo de efeitos aleatórios assume que os estudos não são homogêneos, havendo alguma variação entre os estudos devido a diferenças entre as respectivas populações e protocolos empregados.

O *effect size* considerado para a construção dos *forest plots* foi o *Odds Ratio* e respectivos intervalos de confiança a 95%. Uma vez que os dados publicados são apresentados de diversas formas, ie, média±desvio-padrão (DP) ou *Odds Ratio* (OR), os *effect sizes* foram uniformizados todos para OR. Para os artigos que apresentavam médias±DP foram obtidos as diferenças médias standardizadas (DME) e posteriormente estes valores foram convertidos em OR usando a equação (1):

$$\ln(OR) = DME * \frac{\pi}{\sqrt{3}} \quad (1)$$

A decisão para considerar modelos de efeitos aleatórios ou modelos de efeitos fixos foi feita com base na análise da heterogeneidade entre os estudos e será realizada com base na estatística  $I^2$  e no teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Valores de  $I^2 > 50\%$  e valor-p  $< 0.2$  para  $\chi^2$  consideram-se modelos de efeitos aleatórios.

Um aspeto que pode comprometer a validade de uma meta-análise é a possibilidade de os pressupostos não se verificarem, em virtude de um tipo particular de estudos ser sistematicamente excluído de publicação. Estudos com amostras muito pequenas apresentam maior probabilidade de viés de publicação, motivo pelo qual alguns autores preconizam para que sejam excluídos.

O gráfico de funil (*funnel plot*) é uma ferramenta simples e bastante utilizada para a deteção de viés de publicação. Trata-se de um gráfico de dispersão, considerando-se no eixo das abcissas as medidas de efeito estimadas para cada um dos estudos que compõem a meta-análise, e no eixo das ordenadas o respetivo peso de cada estudo.

Quando o gráfico exhibe uma disposição assimétrica de pontos, há evidência de que o viés de publicação está presente na meta-análise. Na ausência de viés de publicação, a disposição dos pontos no gráfico assemelha-se ao formato de uma pirâmide ou funil invertido.

A meta-análise foi realizada com recurso ao *software* R (V 4.1.2) e as bibliotecas *metafor* e *meta*.

## 4. Resultados

Este capítulo começa com uma descrição detalhada do *outcome* da literatura incluindo um fluxograma que evidencia as etapas da pesquisa. As características dos estudos tais como o ano de publicação dos artigos selecionados, os tipos de estudos incluídos, as características da população, o tipo de amostra biológicas usadas pelos autores para realização dos estudos também são referidas.

É também providenciada a avaliação da qualidade dos estudos elegíveis assim como o *outcome*. Por fim, a análise qualitativa dos metabolitos predominantemente encontrados nos estudos incluídos.

### 4.1. *Outcome* da pesquisa sistemática da literatura

Concluída a pesquisa, obteve-se um total combinado de 2.481 artigos, dos quais 1.084 resultaram da pesquisa na *PubMed* e 1.397 da pesquisa efetuada na *Embase*.

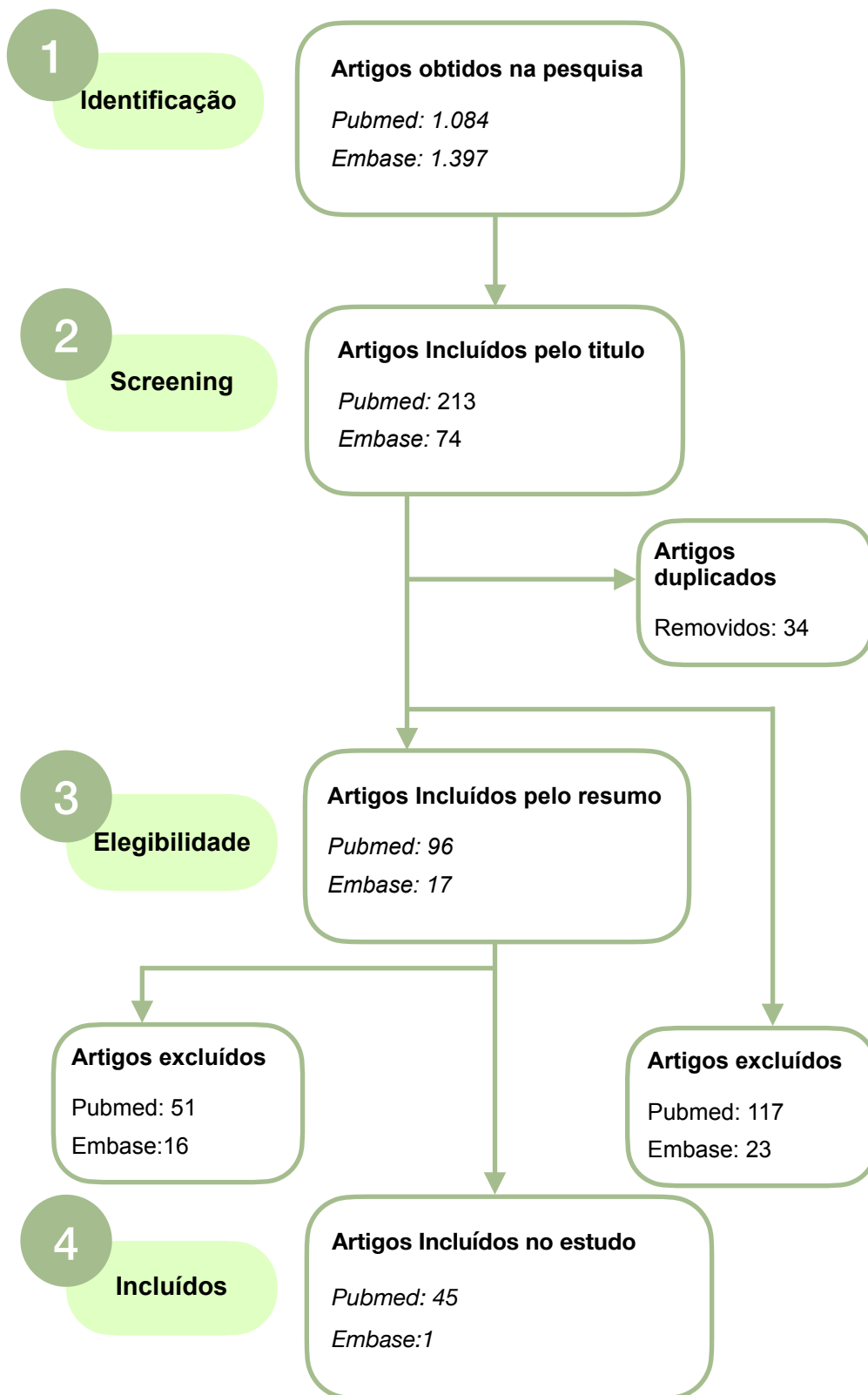
A seleção dos artigos baseou-se em quatro grandes momentos de filtragem dos resultados.

Primeiramente fez-se uma avaliação dos títulos de todos os artigos científicos provenientes da pesquisa. Nesta etapa foram excluídos todos os artigos cujos títulos não indicavam que o propósito do estudo ia ao encontro dos objetivos do presente trabalho. Como produto final desta apreciação passaram à fase seguinte 213 artigos provenientes da *PubMed* e 74 da *Embase*, por outras palavras foram excluídos, pela apreciação do título, 871 artigos da *PubMed* e 1.323 da *Embase*.

Com o auxílio de um gestor eletrônico de referências bibliográficas (*Zotero*) eliminaram-se os artigos em duplicado. Foram excluídos 34 artigos da *Embase* pelo que passaram à fase seguinte 213 artigos provenientes da *PubMed* e 40 da *Embase*.

O terceiro momento de filtragem consistiu na avaliação dos resumos dos 253 artigos que passaram a esta fase (213 *PubMed* e 40 *Embase*). Aqui foram avaliados os dados fornecidos no resumo pelos autores. Sempre que no resumo foi encontrado algum dado que não era compatível com o objetivo deste trabalho ou que mostrasse incompatibilidade com os critérios de elegibilidade estabelecidos, o artigo era excluído. Após esta filtragem foram excluídos no total 140 artigos (117 *PubMed* e 23 *Embase*) pelo que passaram à fase seguinte 96 artigos da *PubMed* e 17 da *Embase*.

O último momento de seleção dos artigos científicos baseou-se na sua análise integral. Nesta etapa foram aplicados os critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos. Na última triagem foram excluídos no total 67 artigos (51 *PubMed* e 16 *Embase*). Neste trabalho foram considerados elegíveis 46 artigos científicos (Figura 2).



**Figura 2. Fluxograma.** Esta representação esquematiza a seleção da literatura sobre a identificação de metabolitos, através de metabolómica, na DT2. Adaptado do modelo PRISMA

## 4.2. Características dos estudos seleccionados

### 4.2.1. Artigos científicos e tipo de estudos

Como evidenciado no gráfico 2, os estudos incluídos para pesquisa dos metabolitos, provêm maioritariamente do período entre 2016 a 2020. Em relação ao tipo de estudos seleccionados para extração de dados, obtiveram-se catorze “cohorts”, vinte e dois “case control” e nove “random clinical trial” (RCT) (Gráfico 3).

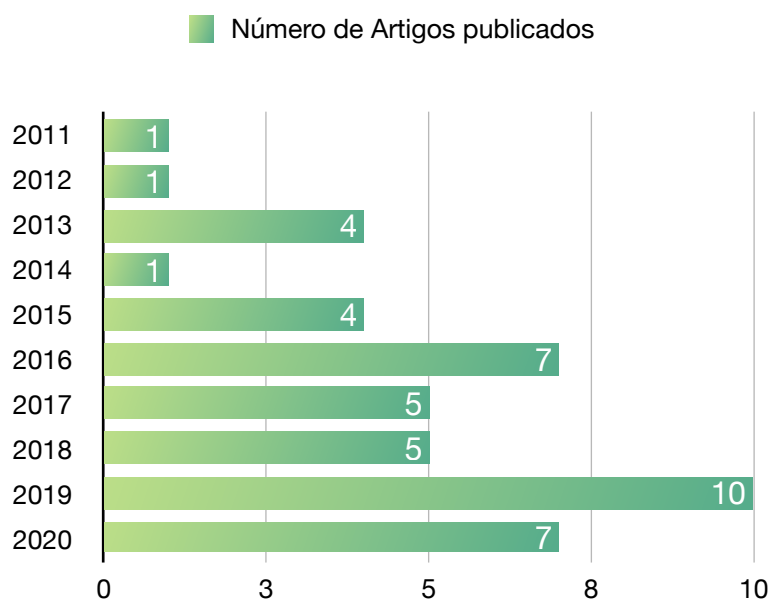


Gráfico 2. Ano de publicação dos artigos seleccionados.

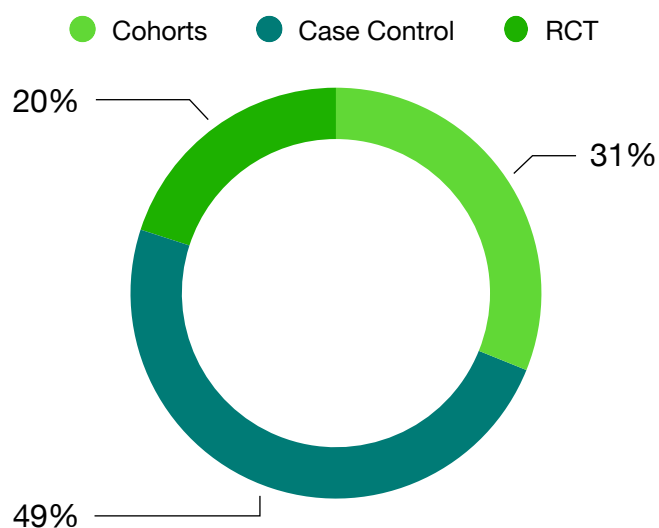
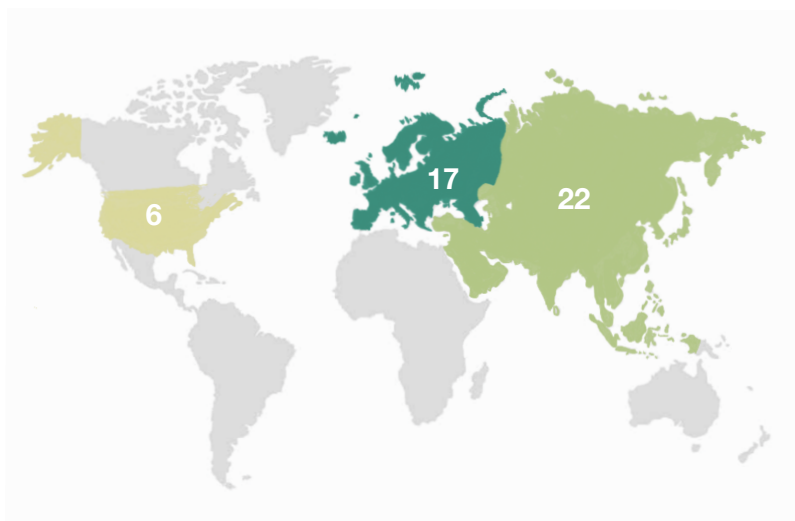


Gráfico 3. Distribuição do tipo de estudos seleccionados.

## 4.2.2. População dos estudos selecionados

A população dos estudos provém de diversos países europeus, asiáticos e americanos (EUA). É importante ter em consideração a origem dos participantes dos estudos uma vez que diversos fatores como a dieta, ambiente e estilo de vida são distintos nos diferentes países. Estes aspetos têm sido apontados como sendo preponderantes para o desenvolvimento da DT2. Na figura 3 estão ilustradas as regiões demográficas de onde provêm os participantes dos estudos selecionados, pelo que se pode constatar que a maior parte dos estudos são efetuados na população asiática seguindo-se da europeia e por fim da americana.



**Figura 3. Proveniência da população dos estudos incluídos.** Número de estudos selecionados para análise sistemática baseados em população proveniente da Europa, Ásia e América do Norte (EUA). Europa 17, Ásia 22 e EUA 6 estudos. Figura produzida com recurso à aplicação “Procreate”.

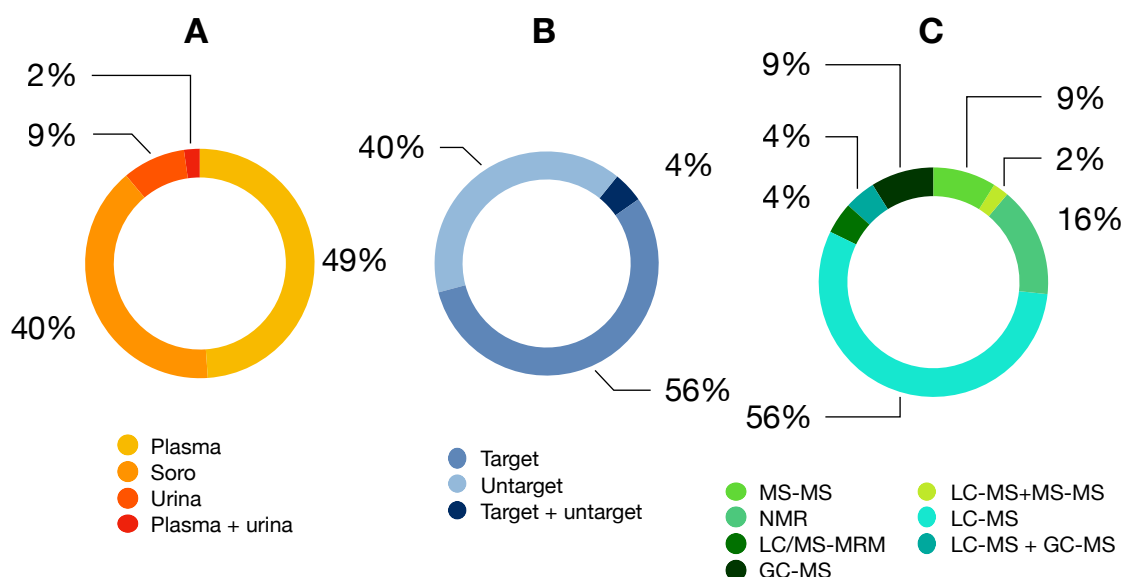
## 4.2.3. Tipos de amostras e abordagem metabolómica

Para a deteção dos metabolitos potencialmente utilizados como biomarcadores da DT2, os autores dos estudos utilizaram como amostras biológicas plasma, soro e urina. A grande maioria dos estudos incluídos baseou a sua análise recorrendo a amostras de plasma (49%). Em sendo lugar, a amostra biológica mais utilizada foi o soro (40%), seguido-se pela urina (9%) e por fim, alguns autores optaram por trabalhar com duas amostras biológicas, no caso, plasma e urina (2%) (Figura 4A).

Em relação à estratégia utilizada pelos autores dos artigos verificou-se que a grande maioria optou por uma abordagem *target*, que contempla 56% dos estudos. A abordagem *untarget* representa 40% dos estudos selecionados e 4% dos autores combinou os dois tipos de abordagens (Figura 4B).

Quanto às técnicas metabolômicas utilizadas pelos autores dos artigos verificou-se que a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) foi amplamente utilizada, correspondendo a 56%. A outra técnica de eleição para os estudos dos metabolitos foi a ressonância magnética nuclear (NMR) que corresponde a 16%. Por outro lado, 9% dos estudos aplicaram a técnica de espectrometria de massa em tandem (MS-MS); a mesma percentagem de artigos (9%) utilizou a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) para obter os seus resultados.

Em minoria, o recurso à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com monitorização de reação múltipla (LC/MS-MRM) correspondendo a 4%, a utilização de ambas as técnicas de LC-MS e GC-MS, também 4% e por fim, 2 % dos artigos combina as técnicas de LC-MS com MS-MS (Figura 4C).



**Gráfico 4. Distribuição do tipo de amostras estratégia e técnica. (A)** Distribuição do tipo de amostras utilizadas nos estudos seleccionados, **(B)** estratégia utilizada pelos autores para identificação dos metabolitos e **(C)** técnica metabolômica escolhida para realizar a investigação.

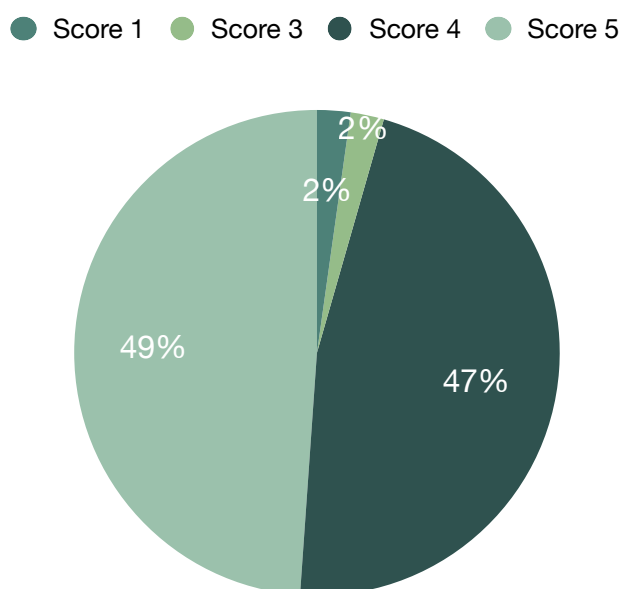
### 4.3. Avaliação da qualidade dos estudos

Para aferir a qualidade dos estudos seleccionados foram utilizadas as diferentes “checklists” disponibilizadas pela *CASP (Critical Appraisal Skills Programme)*.<sup>60</sup> As diferentes “checklists” foram aplicadas de acordo com o tipo de estudo para o qual estão concebidas. Nestas “checklists” são apresentadas algumas questões sobre aspetos críticos da formulação, seleção e execução dos estudos científicos. Para cada pergunta existem três hipóteses de resposta, “sim”, “não sei dizer” e “não”. O investigador responde a cada uma destas perguntas tendo por base a informação disponível no artigo científico que está a avaliar.

Para facilitar o processo de apreciação dos artigos construiu-se, em suporte digital, uma matriz de avaliação dos artigos científicos considerados elegíveis.

A matriz de avaliação compreende as perguntas das “checklists” da *CASP* onde é atribuída uma pontuação de 0 a 2 a cada pergunta. Sendo que o 0 corresponde a “não”, o 1 a “não sei dizer” e o 2 a “sim” (ver apêndice IV). Após responder a todas as questões sobre determinado artigo científico obteve-se uma cotação final para cada um deles, que posteriormente, foi convertida num score de 0 a 5. Com esta medida pretendeu-se uniformizar a pontuação dos artigos, uma vez que para cada tipo de estudo o número de perguntas varia, não sendo possível fazer uma comparação directa.

Dos artigos incluídos, vinte e dois pontuaram o score 5, vinte e um o score 4, um o score 3 e apenas um artigo pontuou 1 dado que a seleção dos indivíduos não era clara e não foi possível, segundo as regras da *CASP*, prosseguir com a avaliação (Gráfico 5).

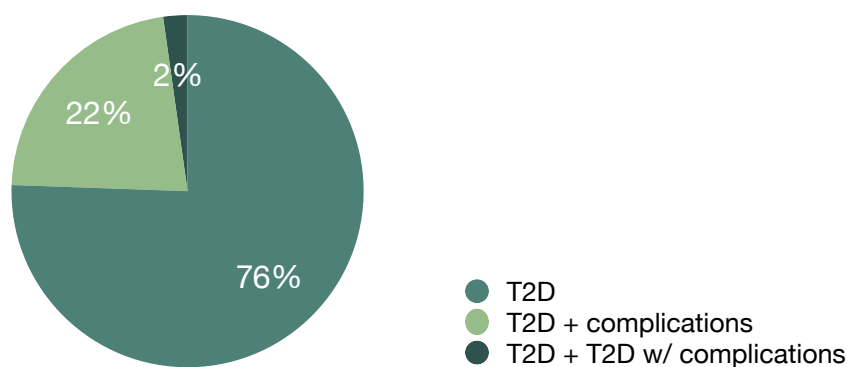


**Gráfico 5. Avaliação da qualidade dos estudos.** Percentagem dos scores atribuídos aos artigos seleccionados após avaliação pelos critérios *CASP* 2021.

#### 4.4. Outcome dos estudos elegíveis

O *outcome* de um estudo de investigação prende-se com o objetivo ao qual os investigadores se propõem responder. Por exemplo, se o objetivo do estudo é identificar metabolitos relacionados com a DT2, o *outcome* poderá ser *há relação ou não há relação com a DT2*.

Após a análise individual dos artigos incluídos neste trabalho, pode aferir-se o *outcome* de cada um dos estudos. Na grande maioria o *outcome* foi “está relacionado com DT2 (no gráfico 6 representado como T2D) correspondendo a 76% (34 artigos) dos artigos incluídos. Apenas 22% (10 artigos) dos artigos tiveram um *outcome* cujos resultados estavam relacionados com DT2 e complicações (T2D + complications). Um dos artigos incluídos, correspondendo 2%, apresenta vários *outcomes*, uns relacionados somente com DT2 e outros com DT2 com complicações (no gráfico 6 representado como T2D + T2D w/ complications).



**Gráfico 6. Outcome.** Distribuição dos *outcomes* dos artigos incluídos no estudo.

#### 4.5. Metabolitos referenciados nos estudos

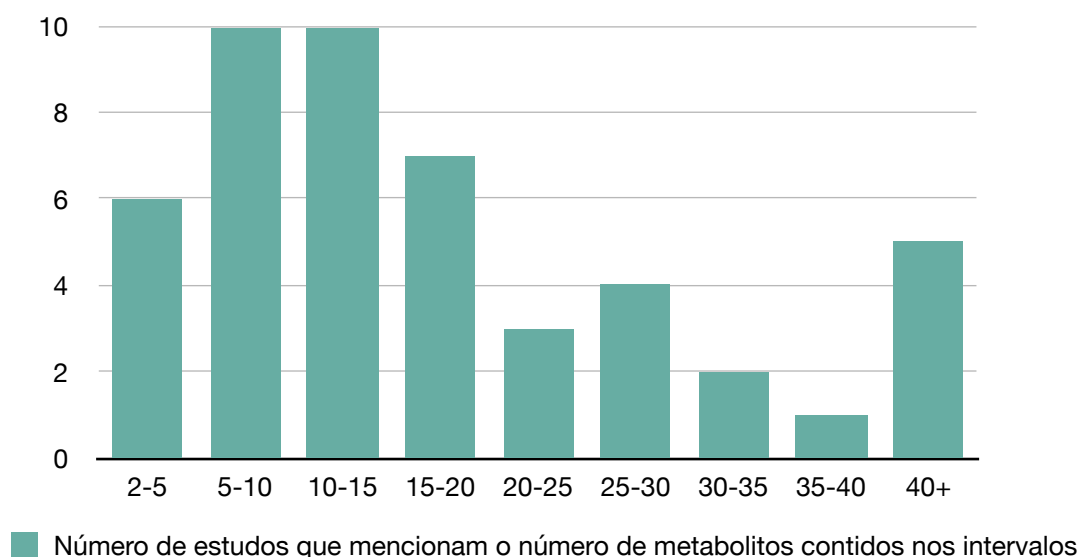
##### 4.5.1. Número de metabolitos referenciados

Os metabolitos referenciados pelos autores dos estudos foram contabilizados de forma a verificar quais os mais frequentemente encontrados.

Ao todo foram reportados pelos autores dos 45 estudos incluídos 2.514 metabolitos; sendo que alguns deles mencionados por vários autores.

O número de metabolitos encontrados em cada um dos estudos foi variável. Pela análise do gráfico 7 verifica-se que o número de metabolitos encontrados nos estudos são muito variáveis. Existem estudos que reportam poucos metabolitos, por exemplo, existem 6

estudos que reportam entre 2 a 5 metabólitos; e outros onde são reportados mais de quarenta metabólitos. Pelo gráfico pode observar-se que a maioria dos estudos reporta entre 5 a 20 metabólitos.



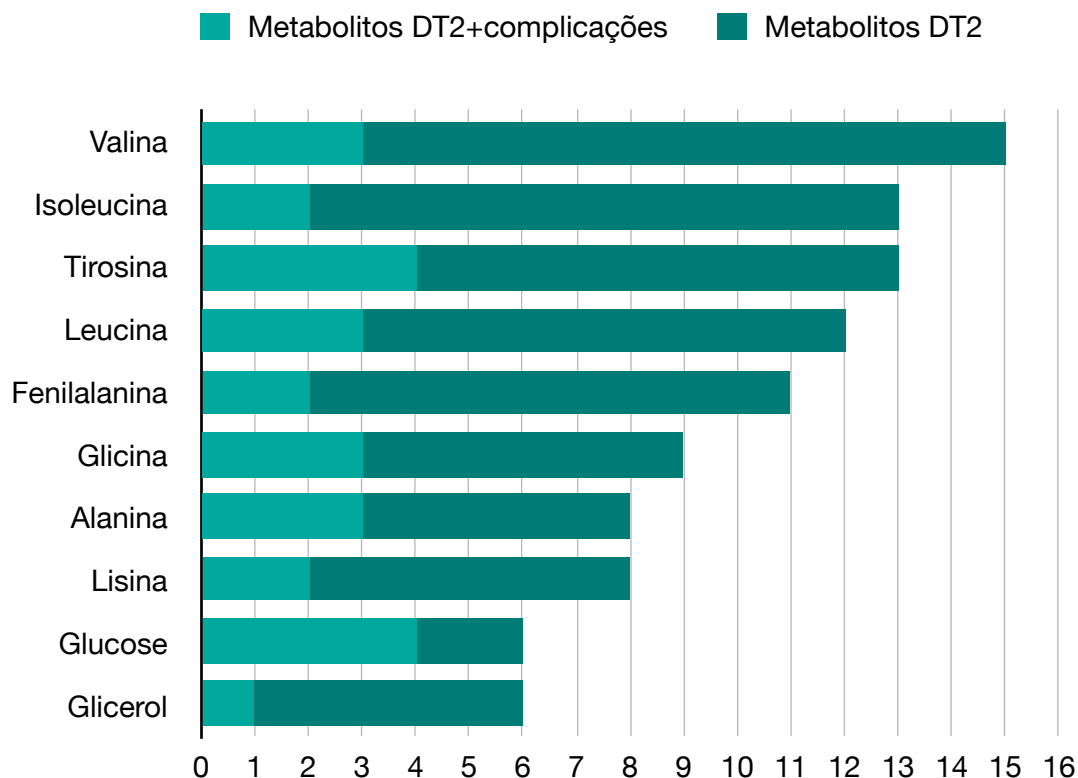
**Gráfico 7. Número de metabólitos por estudo.** No eixo dos xx estão representados o intervalo de número de metabólitos apresentados pelos autores dos artigos incluídos, no eixo dos yy o número de artigos.

#### 4.5.2. Análise qualitativa dos metabólitos referenciados

Após a contabilização global dos metabólitos, mencionados nos 45 estudos incluídos, verificou-se que o metabólito mais referenciado foi a valina, encontrada em 33% dos estudos. Por ordem descendente foram identificados a isoleucina e tirosina (29%), leucina (27%), fenilalanina (24%), glicina (20%) alanina e lisina (18%), glicerol e glucose (13%), glutamina e triptofano (11%), prolina, lactato, ureia e treonina (9%), ornitina, manose, serina, citrato, glutamato, metionina e piruvato (8%) (Gráfico 8). Os restantes metabólitos tiveram uma expressão entre 4 e 2% o que significa que foram reportados uma ou duas vezes pelos autores.

Relativamente aos metabólitos associados às complicações decorrentes da DT2 verificou-se que apenas 10 artigos tinham a DT2 associada a complicações como *outcome*. Dentro das complicações os metabólitos com maior expressão foram a tirosina e a glucose correspondendo a 40% dos estudos, seguindo-se da alanina, valina, leucina, arginina, prolina, glicina e triptofano que foram referidos em 30% dos estudos. Com a expressão de 20% foram reportados os metabólitos lactose, eritrol, acetato, manose, glutamina, treonina, histidina, metionina, serina, ácido glicónico, lisina, fenilalanina e isoleucina.

Foram mencionados outros metabolitos mas com expressão residual equivalente a 1 referência.



**Gráfico 8. Número de vezes que um metabolito é reportado.** Metabolitos mais referenciados nos artigos científicos incluídos na DT2 e na DT2 associada a complicações.

Quando comparados os metabolitos entre os grupos de indivíduos com DT2 com controlos (Tabela 2), verificou-se que a maioria dos estudos refere que os aminoácidos valina, isoleucina, tirosina, leucina, fenilalanina, alanina estão aumentados assim como a glucose e o glicerol na presença de DT2.

Por sua vez, relativamente à glicina e à lisina a maioria dos artigos refere concentrações mais baixas na DT2.

Curiosamente, de uma forma geral, os estudos direcionados às complicações da DT2, apresentam os valores de metabolitos mais baixos comparativamente aos grupos de indivíduos com DT2 e sem complicações.

Autor / Ano	Metabolitos										Outcome
	Val	Iso	Tyr	Leu	Phe	Gly	Ala	Lys	Glu	Glycerol	
Casey M. Rebholz <i>et al.</i> , 2018	●	●		●					●		DT2
Lin Shi <i>et al.</i> , 2018	●	●	●	●	●		●				DT2
Yonghai Lu <i>et al.</i> , 2016	●	●		●		●				●	DT2
Jun Ho Yun <i>et al.</i> , 2019	●		●			●		●			DT2
Gaokun Qiu <i>et al.</i> , 2016	●	●	●	●	●		●				DT2
Ari V. Ahola-Olli <i>et al.</i> , 2019	●	●	●	●	●					●	DT2
Huan-Tang Lin <i>et al.</i> , 2019	●		●	●	●		●		●		DT2
Danxia Yu <i>et al.</i> , 2015	●					●			●		DT2
Fengguo Xu <i>et al.</i> , 2013	●	●	●	●	●		●				DT2
Xinfeng Liu <i>et al.</i> , 2016	●	●	●	●		●	●		●		DT2+DCV
Navdeep Gogna <i>et al.</i> , 2014	●	●		●	●			●	●	●	DT2
Ele Ferrannini <i>et al.</i> , 2013	●	●	●	●	●	●	●	●			DT2+ Disglicemia
Diane M. Libert <i>et al.</i> , 2018	●	●		●	●						DT2
Wenjuan Lin <i>et al.</i> , 2020	●	●	●			●	●	●	●	●	DT2
Laura del Coco <i>et al.</i> , 2019	●	●	●	●	●		●	●			DT2+ Complicações
Jun Liu <i>et al.</i> , 2017		●	●							●	DT2
Jordi Merino <i>et al.</i> , 2018					●	●					DT2
Clara Barrios <i>et al.</i> , 2018					●	●				●	DT2
Samira Salihovic <i>et al.</i> , 2020			●								DT2
Jun Ho Yun <i>et al.</i> , 2020			●					●			DT2+ Retinopatia
Ai-hua Zhang <i>et al.</i> , 2013						●		●			DT2
Filip Ottosson <i>et al.</i> , 2020								●			DT2+DCV

**Tabela 2. Variação dos metabolitos entre grupos.** A tabela indica a variação dos metabolitos entre os grupos DT2 vs controlo, quando o *outcome* é DT2 e DT2 vs DT2 com complicações quando o *outcome* é DT2 + complicação.

● significa que houve aumento do metabolito no grupo com DT2 ou DT2 com complicações, ● significa que houve diminuição e ● significa que o valor está mantido nos dois grupos. Val = valina; Iso = Isoleucina; Tyr = Tirosina; Leu = Leucina; Phe = Fenilalanina; Gly = Glicina; Ala = Alanina; Lys = Lisina; Glu = Glucose.

## 4.6. Meta-análise

A meta-análise foi realizada para 9 metabolitos considerando a comparação entre os indivíduos com DT2 e controlos e para 6 metabolitos entre indivíduos com DT2 e indivíduos com DT2 e outras complicações. Foram considerados os estudos que apresentavam dados possíveis para realizar a meta-análise (OR e média das concentrações relativas dos metabolitos).

A diferença entre o número de metabolitos associados à DT2 e à DT2 com complicações deve-se ao facto do número de estudos seleccionados para cada um destes grupos ser bastante díspar.

Inicia-se com apresentação dos resultados obtidos na comparação entre os indivíduos com DT2 e controlos e de seguida os DT2 com os DT2 com complicações. Para cada metabolito foram obtidos os gráficos *forest plot* e *funnel plot*.

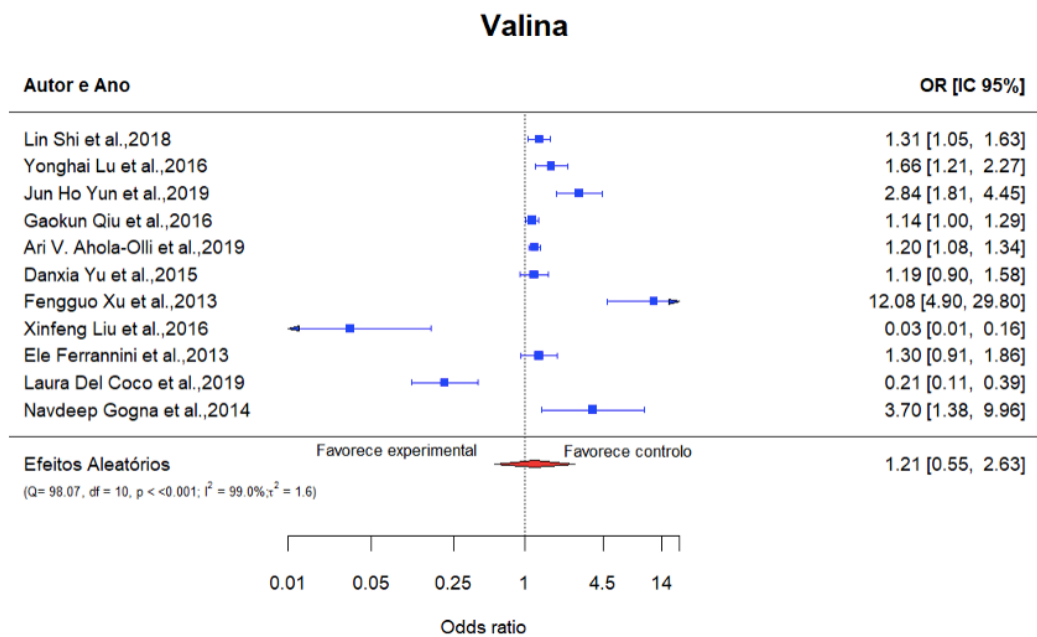
### 4.6.1 Metabolitos associados à DT2

A pesquisa de metabolitos associados à DT2 foi realizada comparando o grupo de indivíduos sem diabetes com o grupo de indivíduos com diabetes tipo 2.

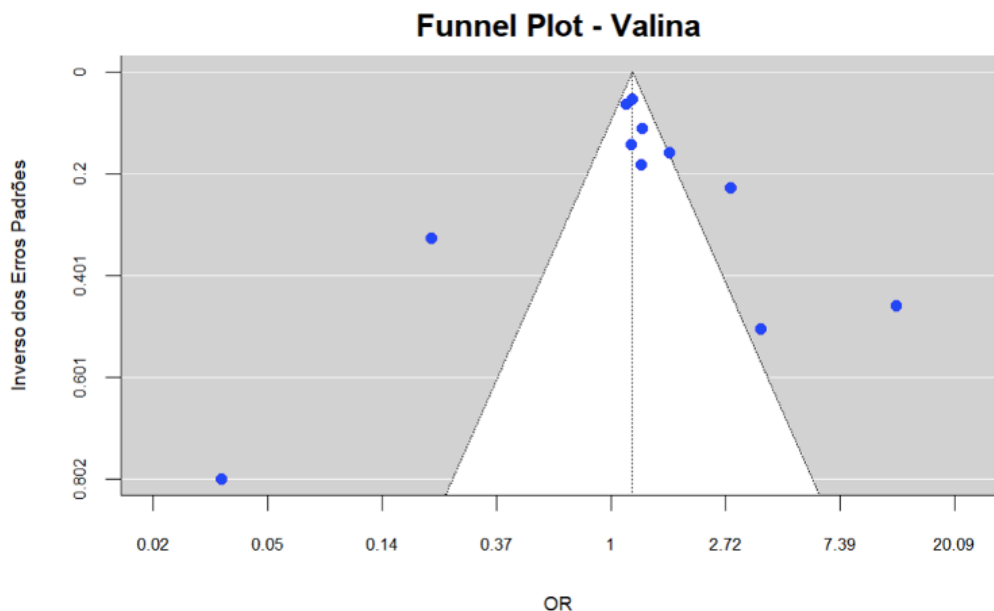
Para todos os metabolitos foram considerados modelos de efeitos aleatórios uma vez que a estatística  $I^2$  é superior a 50% e os valores-p  $<0.001$  para o  $\chi^2$ . Analisando os gráficos *forest plot* para todos os metabolitos podemos verificar que as concentrações da Valina (OR=1.21 [0.55; 2.63]), Isoleucina (OR=1.42, [0.61;3.32]), Fenilalanina (OR=1.27, [0.46;3.51]), Leucina (OR=1.37, [1.27, 1.47]), Tirosina (OR=1.20, [0.80;1.79]), Glicina (OR=1.74, [1.04;2.94]), Glicerol (OR=1.31, [0.66;2.62]) são superiores nos indivíduos com DT2. Em relação aos metabolitos Alanina (OR=0.53, [0.48,0.58]) e Lisina (OR=0.38, [0.03; 4.79]) as concentrações são superiores no grupo de controlo.

Após análise dos *funnel plot* para todos os metabolitos pode concluir-se que existe viés de publicação.

- Valina

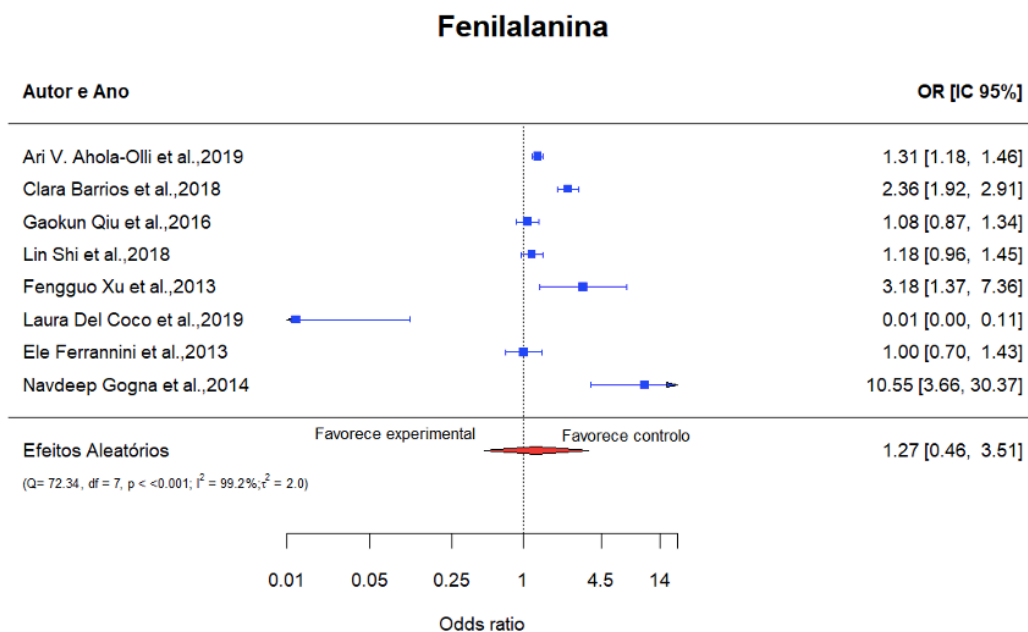


**Gráfico 9.** *Forest plot*: comparação dos OR e IC a 95% entre o grupo de indivíduos com DT2 (grupo experimental) e grupo controle, usando um modelo de efeito aleatórios para a valina.

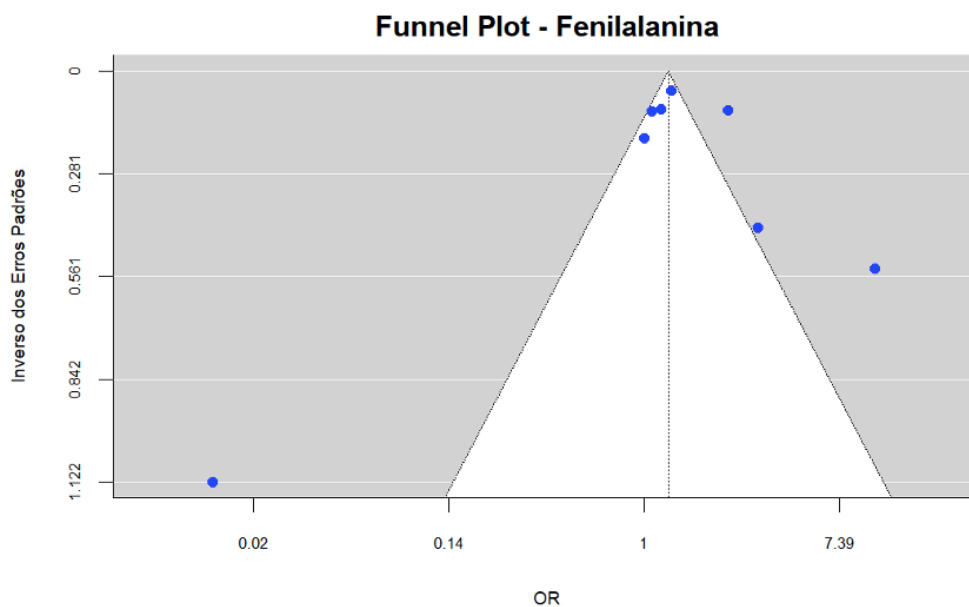


**Gráfico 10.** *Funnel plot* da valina.

- Fenilalanina

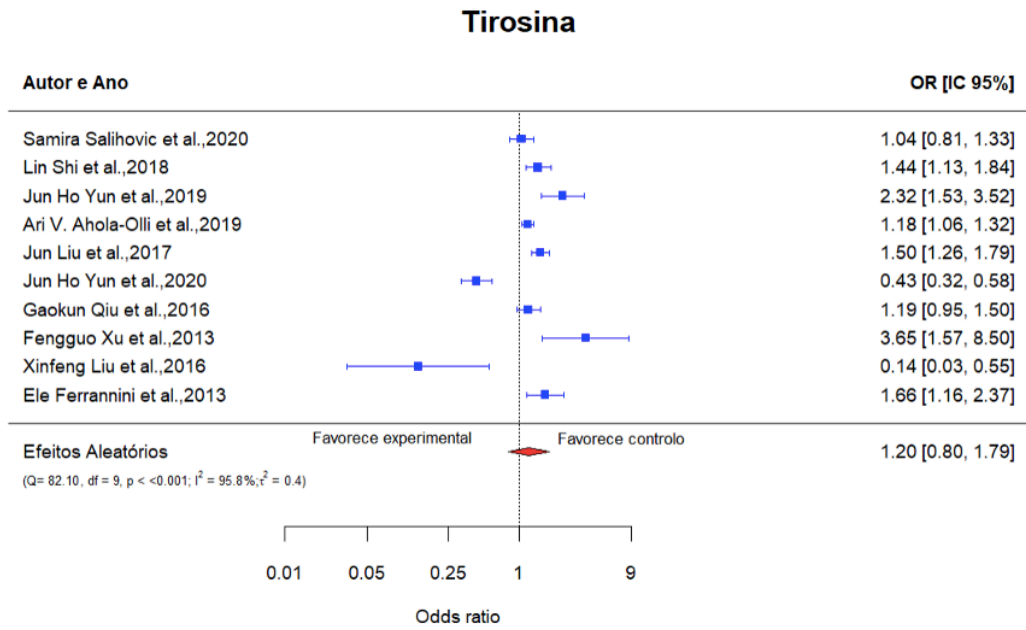


**Gráfico 11.** *Forest plot*: comparação dos OR e IC a 95% entre o grupo de indivíduos com DT2 (grupo experimental) e grupo controlo, usando um modelo de efeito aleatórios para a fenilalanina.

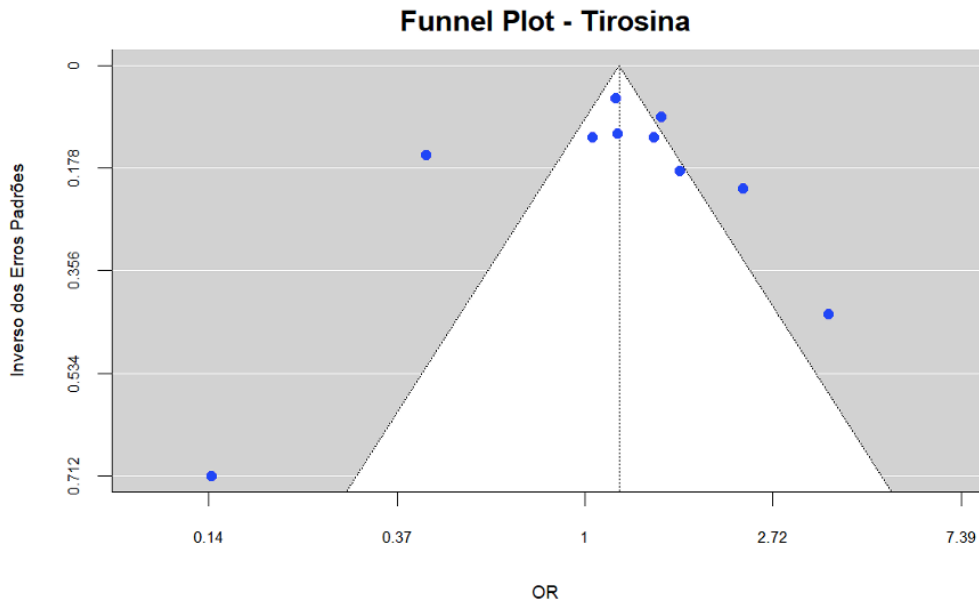


**Gráfico 12.** *Funnel plot* da fenilalanina.

- Tirosina



**Gráfico 13.** *Forest plot*: comparação dos OR e IC a 95% entre o grupo de indivíduos com DT2 (grupo experimental) e grupo controle, usando um modelo de efeito aleatórios para tirosina.



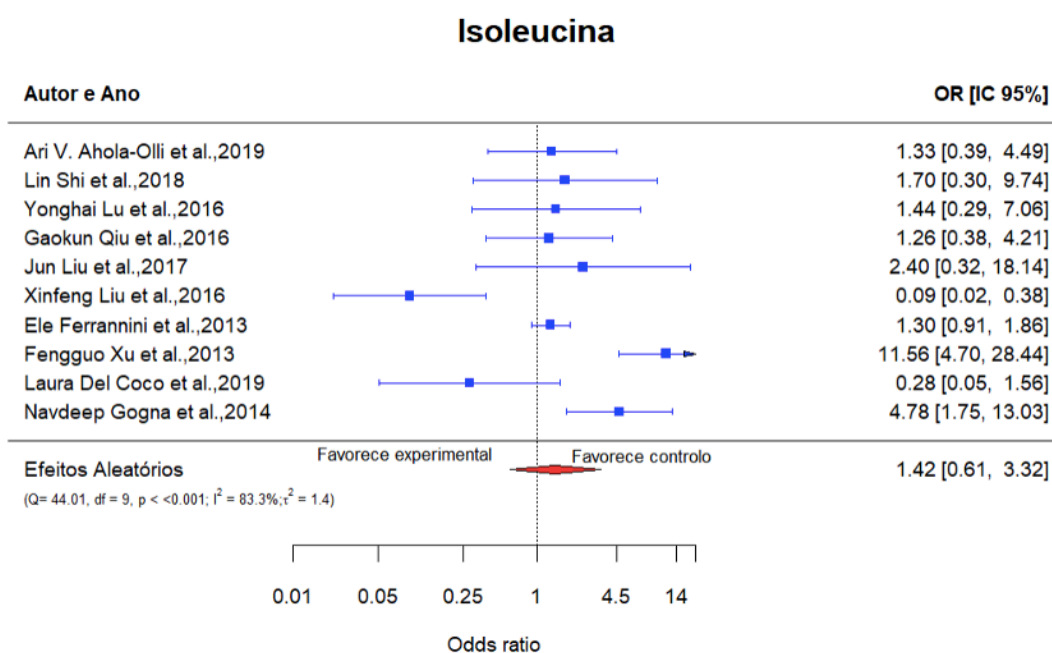
**Gráfico 14.** *Funnel plot* da tirosina.

- Interpretação de resultados: valina, fenilalanina e tirosina

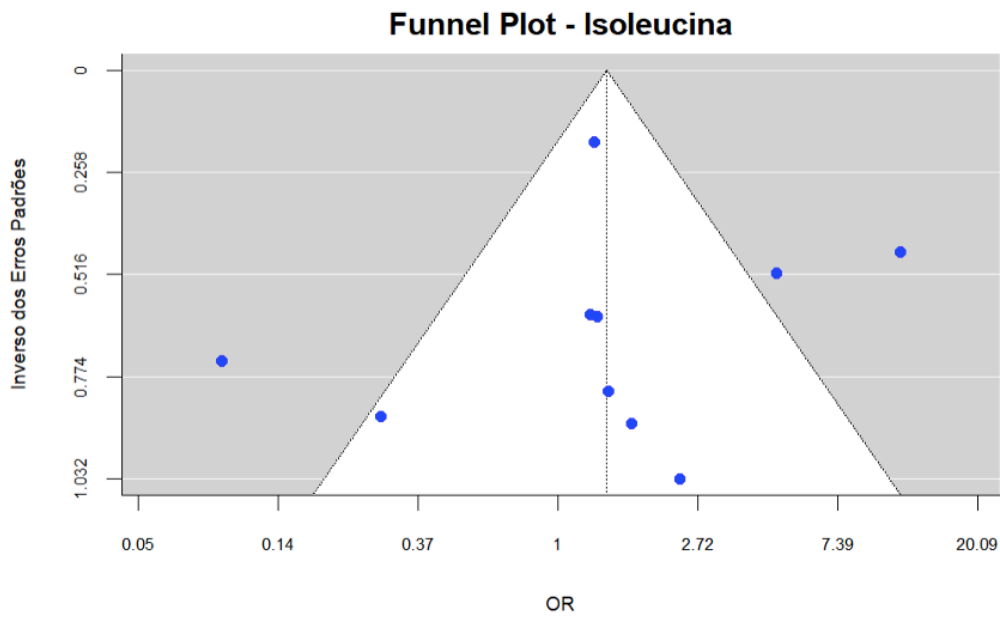
A partir da observação dos gráficos *forest plot* da valina, fenilalanina e tirosina verifica-se que existe um risco aumentado para desenvolver a DT2 em indivíduos com valores mais aumentados. No entanto, os resultados da meta-análise mostram que o efeito não é significativo para estes metabolitos. Observam-se ainda elevados valores de heterogeneidade entre os estudos ( $I^2 > 75\%$ ).

Por sua vez, nos *funnel plot*, observa-se dispersão dos resultados indicando haver presença de viés de publicação. Também é possível observar que os resultados obtidos são principalmente suportados por estudos com menor erro padrão, geralmente estudos de maiores dimensões.

- Isoleucina



**Gráfico 15.** *Forest plot*: comparação dos OR e IC a 95% entre o grupo de indivíduos com DT2 (grupo experimental) e grupo controlo, usando um modelo de efeito aleatórios para a isoleucina.



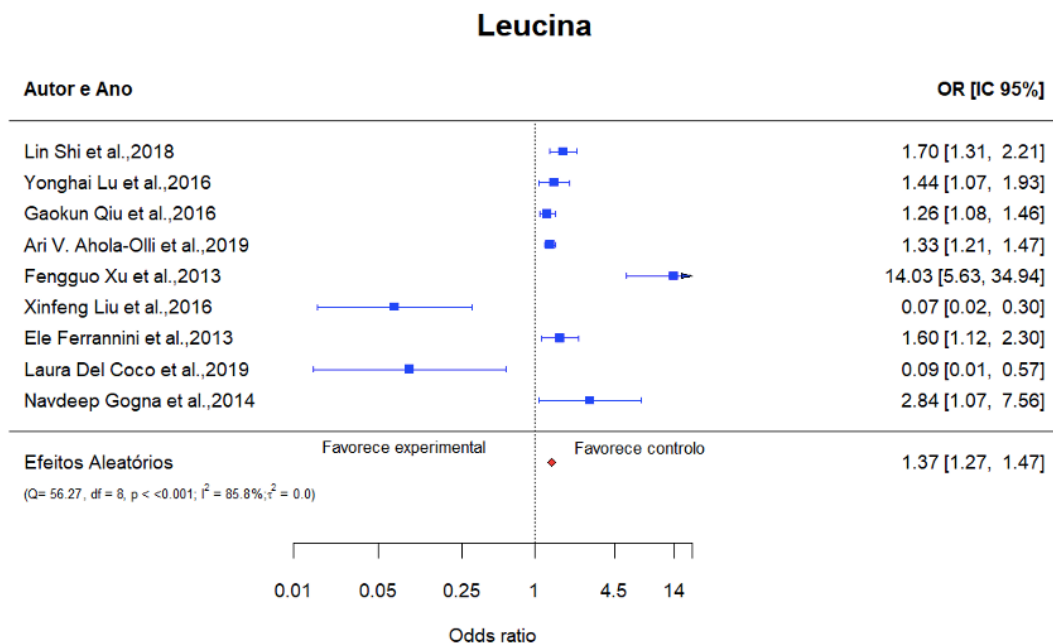
**Gráfico 16.** *Funnel plot* da isoleucina.

- Interpretação de resultados: isoleucina

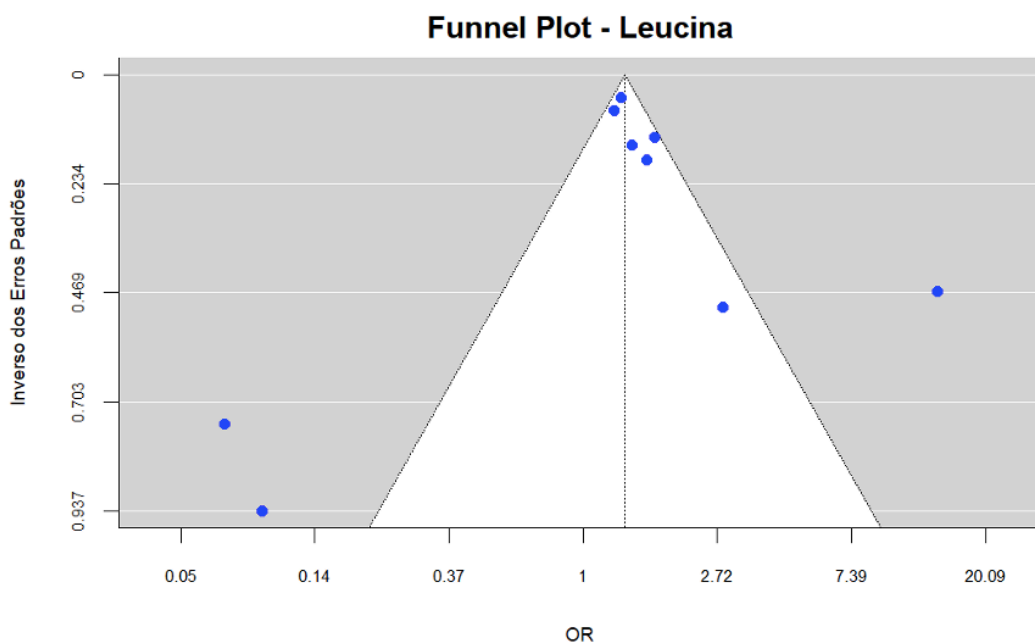
Neste caso, 8 em 10 estudos mostram que existe um risco aumentado para desenvolver a DT2 em indivíduos que apresentam valores mais elevados. Porém, os estudos parecem ser pouco significativos; apresentando muitos deles intervalos de confiança muito elevados. Também a heterogeneidade entre eles é muito aumentada ( $I^2=83.3\%$ ).

A observação do *funnel plot* mostra menor dispersão quando comparado como metabolitos referidos anteriormente. Estudos com diferentes dimensões contribuíram para o resultado da meta-análise.

- Leucina



**Gráfico 17.** *Forest plot*: comparação dos OR e IC a 95% entre o grupo de indivíduos com DT2 (grupo experimental) e grupo controle, usando um modelo de efeito aleatórios para a leucina.



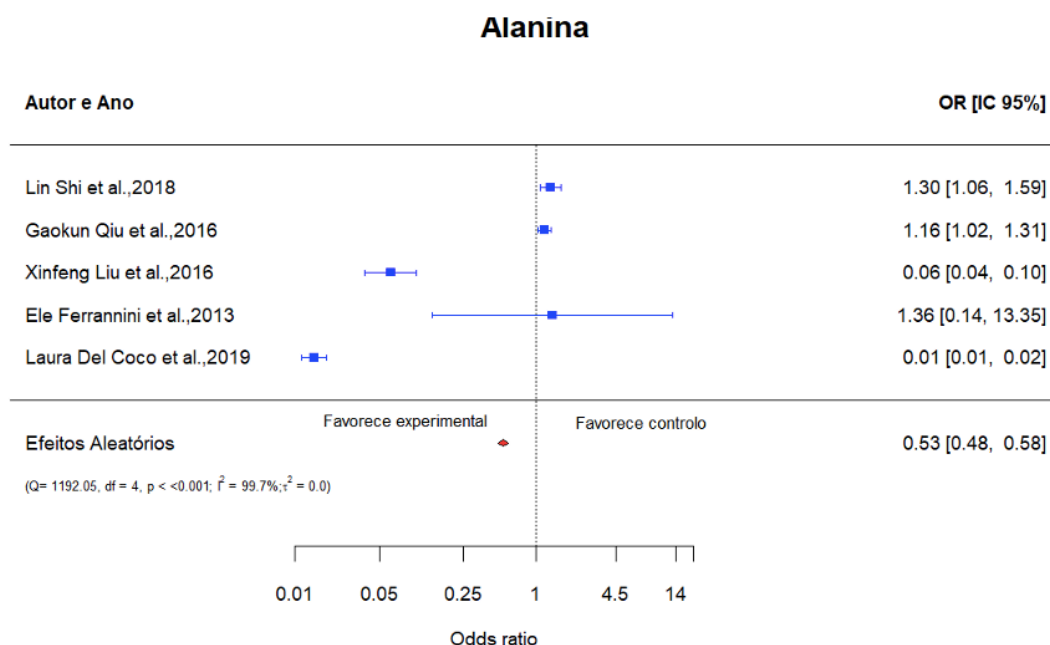
**Gráfico 18.** *Funnel plot* da leucina.

- Interpretação de resultados: leucina

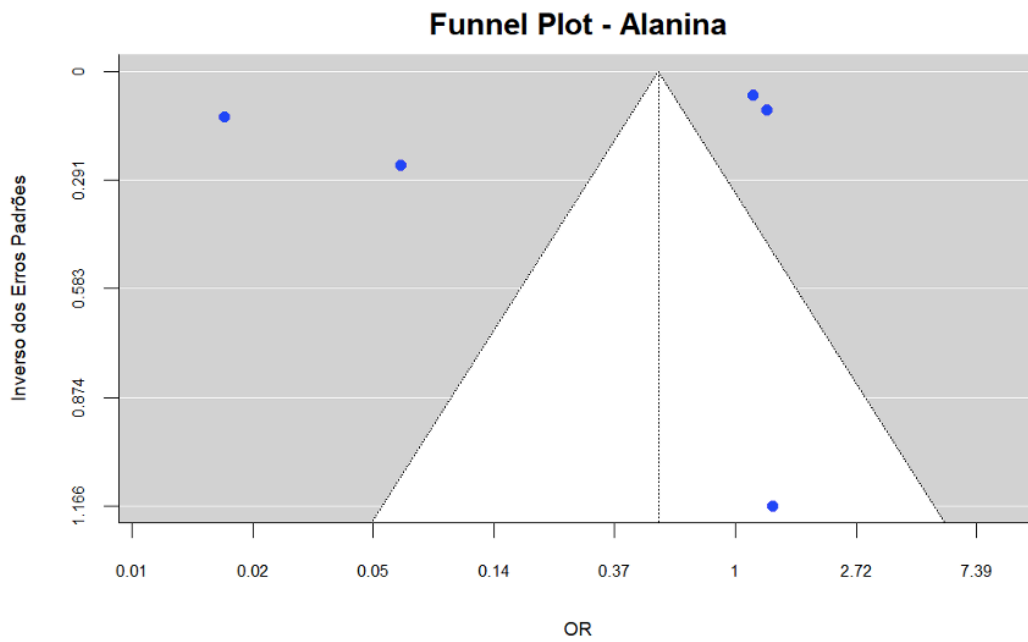
Pela observação do *forest plot* da leucina verifica-se que a maioria dos estudos indica que existe um risco significativo de desenvolver DT2 em indivíduos com valores mais elevados. Pelo *forest plot* pode observar-se que o resultado da meta-análise é significativo (OR=1.37, ]1.27, 1.47[). Permitindo assim afirmar com mais segurança a associação entre os níveis elevados deste metabolito e o desenvolvimento de DT2.

Contudo, o *funnel plot* mostra que este resultado é essencialmente obtido por estudos de maiores dimensões consequentemente menor erro padrão.

- Alanina



**Gráfico 19.** *Forest plot*: comparação dos OR e IC a 95% entre o grupo de indivíduos com DT2 (grupo experimental) e grupo controlo, usando um modelo de efeito aleatórios para a alanina.

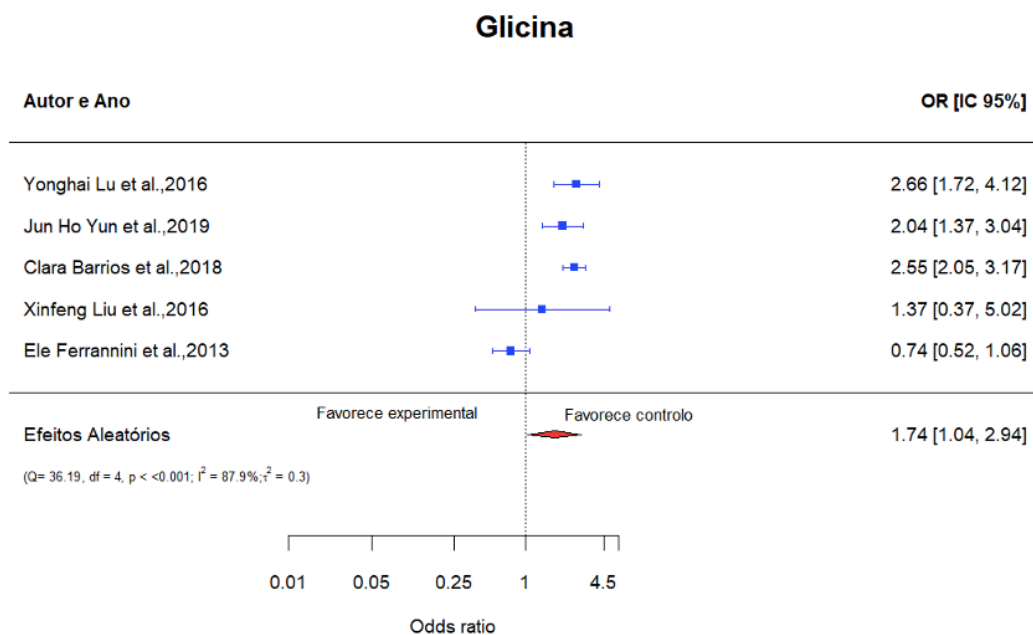


**Gráfico 20.** *Funnel plot* da alanina.

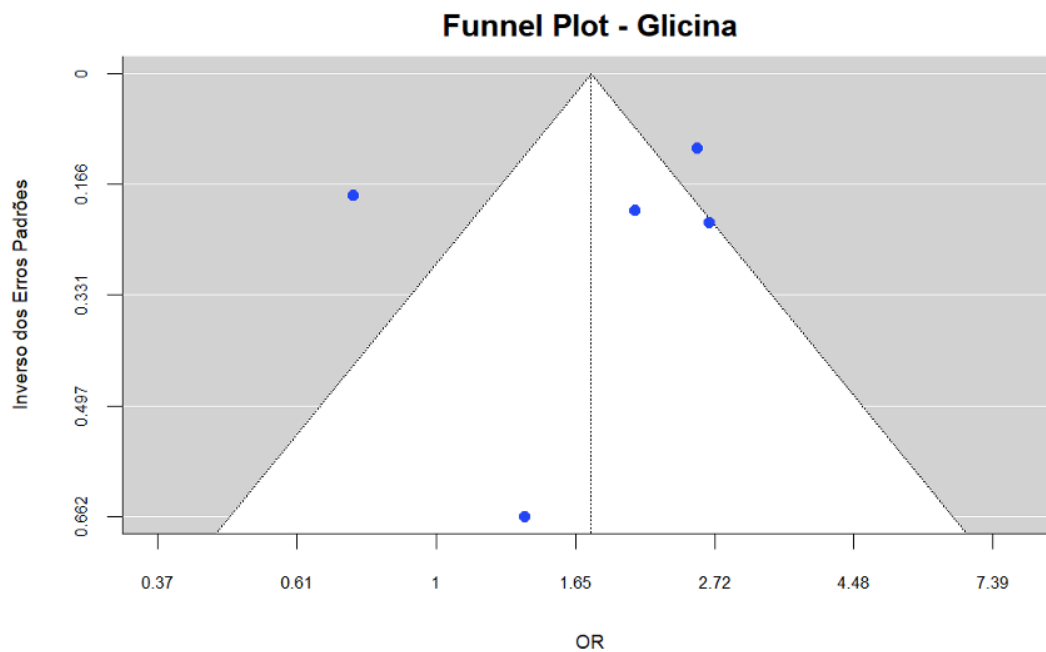
- Interpretação de resultados: alanina

Pela análise do *forest plot* da alanina, poderia ser afirmado que este metabolito representa um fator protetor para o desenvolvimento da DT2, o que sugere um menor risco para desenvolver a doença (OR=0.53, ]0.48,0.58[). Contudo, a heterogeneidade dos estudos é muito elevada ( $I^2=99.7\%$ ) e o *funnel plot* mostra elevado enviesamento nas publicações o que compromete esta afirmação.

- Glicina



**Gráfico 21.** *Forest plot*: comparação dos OR e IC a 95% entre o grupo de indivíduos com DT2 (grupo experimental) e grupo controlo, usando um modelo de efeito aleatórios para a glicina.

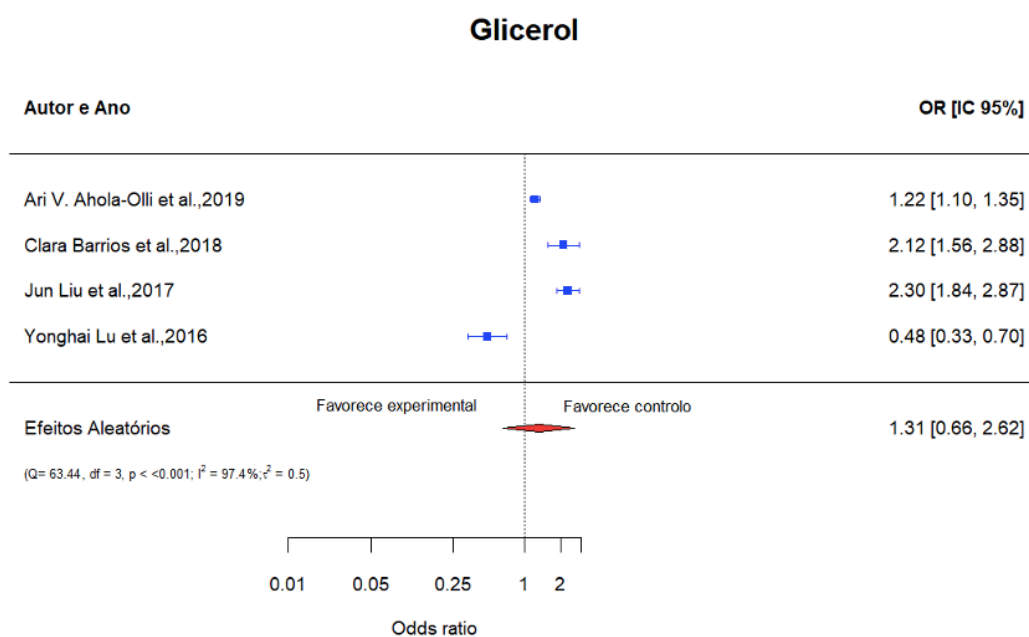


**Gráfico 22.** *Funnel plot* da glicina.

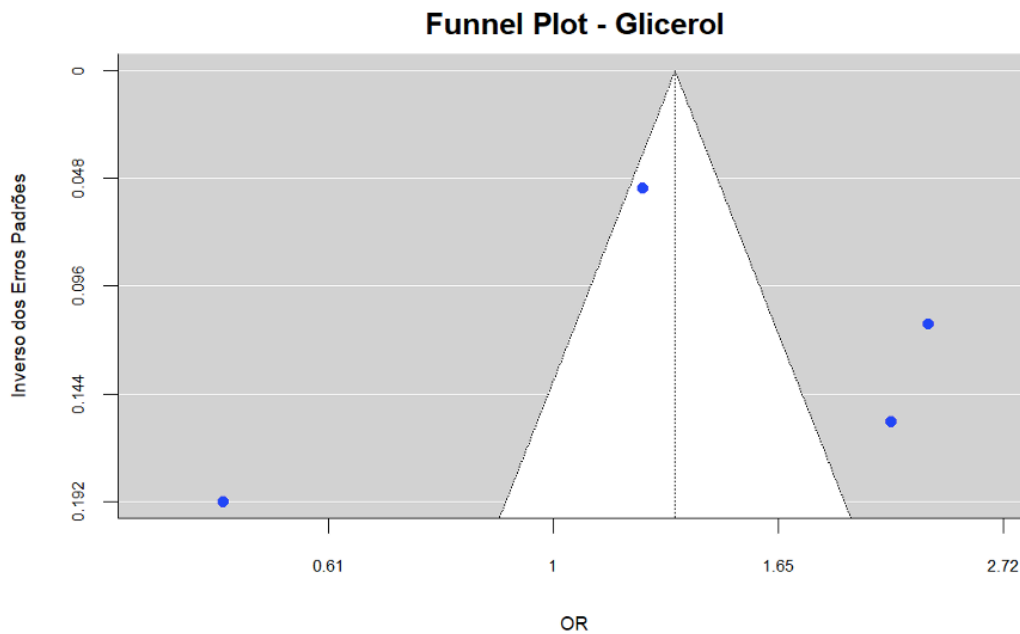
- Interpretação de resultados: glicina

Pela interpretação do *forest plot* da glicina pode dizer-se que esta representa um maior risco de desenvolver a patologia em indivíduos com níveis mais elevados (OR=1.74, ]1.04;2.94]). Contudo, a elevada dispersão dos resultados observada no *funnel plot* indica elevado enviesamento nas publicações.

- Glicerol



**Gráfico 23** *Forest plot*: comparação dos OR e IC a 95% entre o grupo de indivíduos com DT2 (grupo experimental) e grupo controlo, usando um modelo de efeito aleatórios para o glicerol.

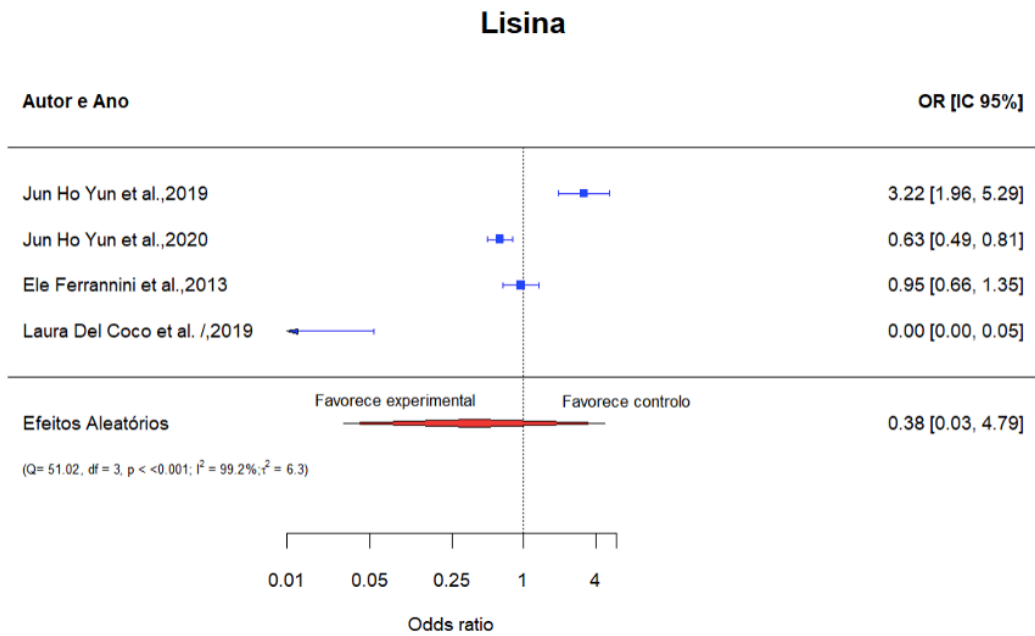


**Gráfico 24.** *Funnel plot* do glicerol.

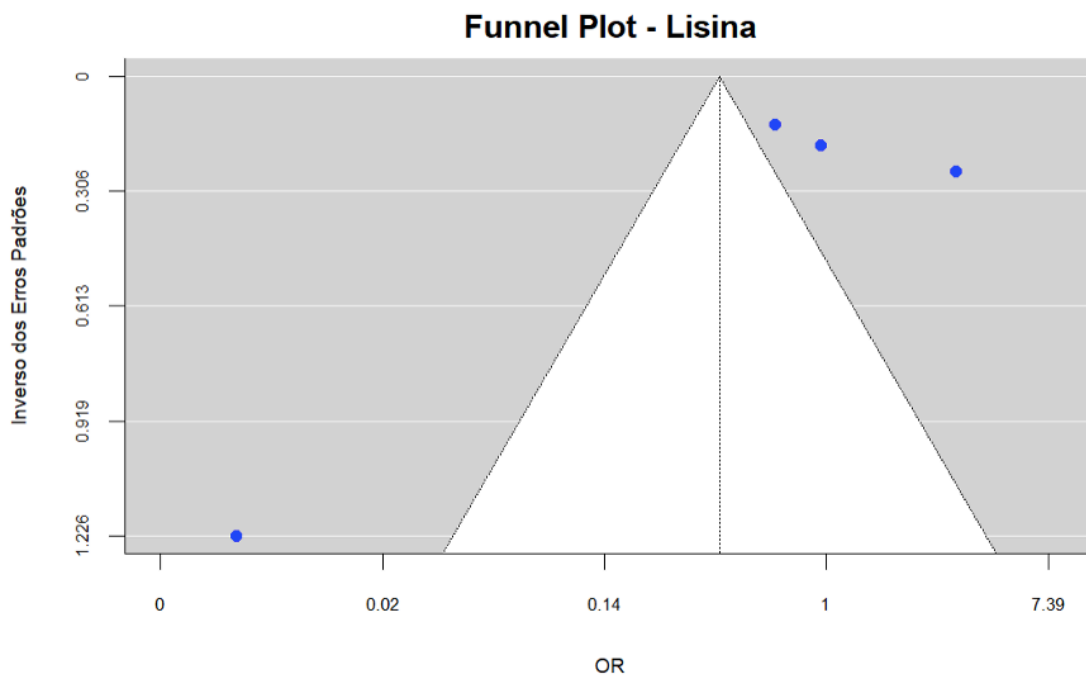
- Interpretação de resultados: glicerol

Segundo a interpretação do *forest plot* verifica-se que o glicerol está aumentado em indivíduos com DT2 pelo que representa um risco aumentado de desenvolver a patologia. Contudo o número de estudo incluídos é baixo e o resultado não é significativo (OR=1.31, ]0.66;2.62[). Observa-se também elevada heterogeneidade ( $I^2=97.4\%$ ) e elevado viés de publicação.

- Lisina



**Gráfico 25.** *Forest plot*: comparação dos OR e IC a 95% entre o grupo de indivíduos com DT2 (grupo experimental) e grupo controlo, usando um modelo de efeito aleatórios para a lisina.



**Gráfico 26.** *Funnel plot* da lisina.

- Interpretação de resultados: lisina

Pelo *forest plot* observa-se que a lisina está diminuída nos indivíduos com DT2 podendo indicar um efeito protetor em relação ao desenvolvimento da doença, no entanto o resultado do efeito não é significativo. Também se observa para este metabolito elevada heterogeneidade e enviesamento.

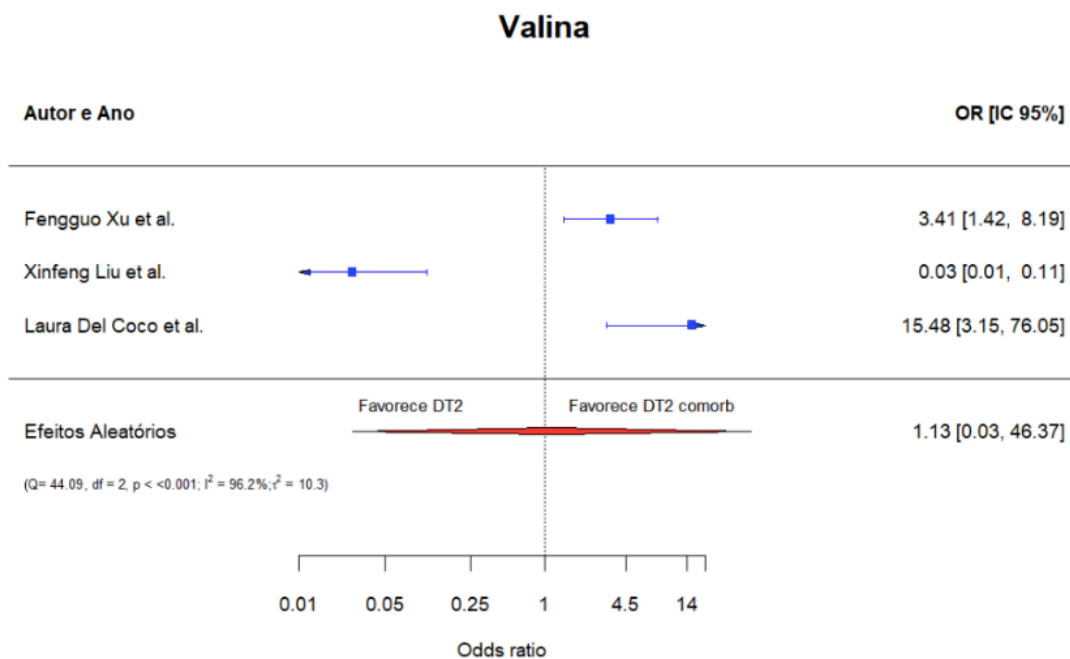
#### 4.6.2. Metabolitos associados à DT2 com complicações

A pesquisa de metabolitos associados às complicações da DT2 foi realizada comparando o grupo de indivíduos com DT2 sem complicações com o grupo de indivíduos com DT2 e complicações.

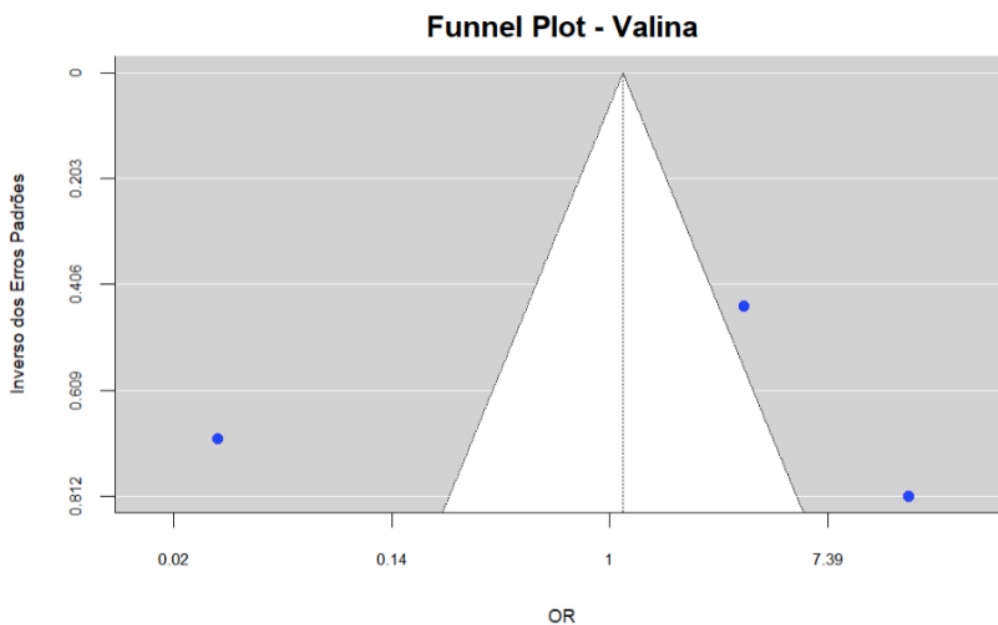
Para todos os metabolitos foram considerados modelos de efeitos aleatórios uma vez que a estatística  $I^2$  é superior a 50% e os valores-p  $<0.001$  para o  $\chi^2$ . Analisando os gráficos *forest plot* para todos os metabolitos podemos verificar que as concentrações da Valina (OR=1.13]0.03; 46.37[]), Isoleucina (OR=2.13]0.23;19.61[]), Fenilalanina (OR=2.66]0.65; 10.88[]), Leucina (OR=1.60]0.27; 9.49[]), são superiores nos indivíduos com DT2 e outras complicações. Em relação aos metabolitos Tirosina (OR=0.45]0.07; 2.95[]) e Alanina (OR=0.44]0.07; 2.72[]) estes estão em menor concentração nos indivíduos com DT2 e outras complicações.

No entanto, pela observação dos *funnel plot* pode observar-se que para todos eles há viés de publicação.

- Valina

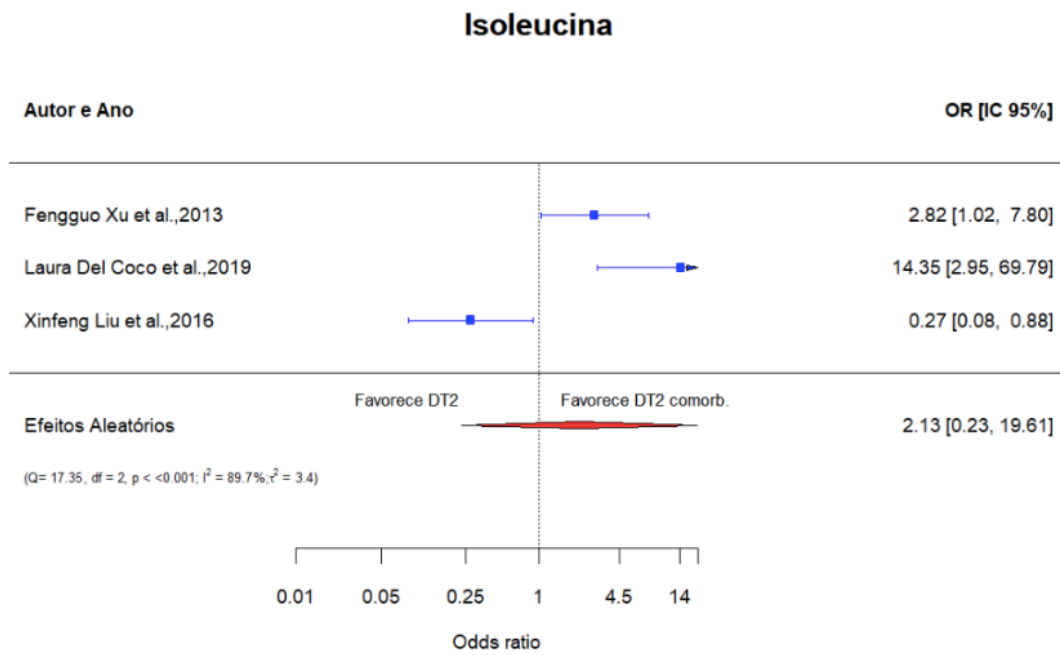


**Gráfico 27.** *Forest plot*: comparação dos OR e IC a 95% entre o grupo de indivíduos com DT2 e complicações (grupo experimental) e indivíduos com DT2, usando um modelo de efeito aleatórios para a valina.

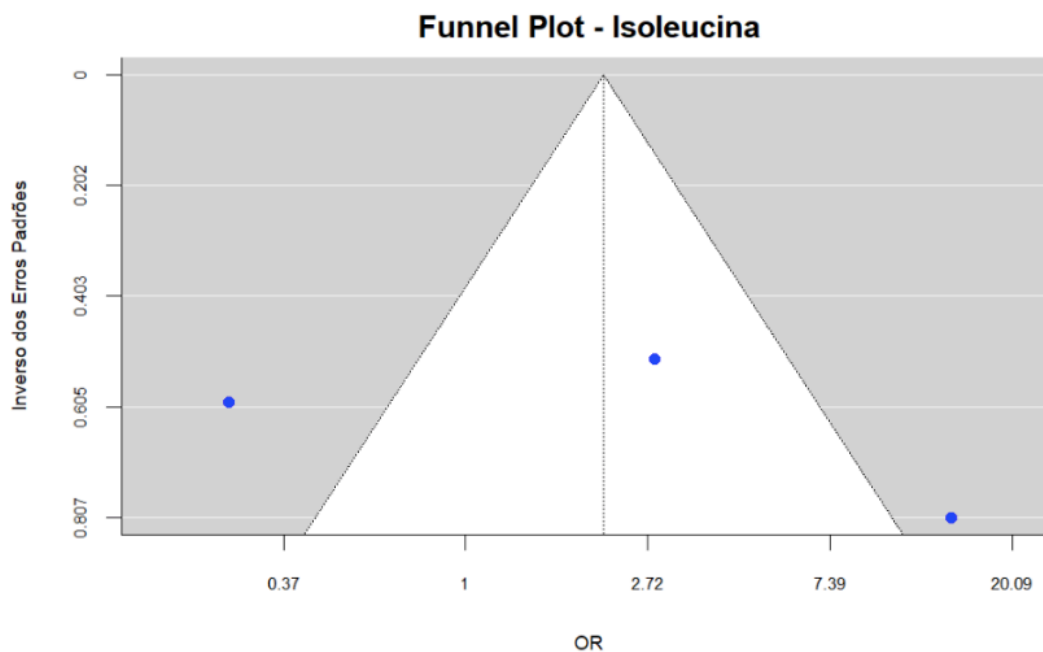


**Gráfico 28.** *Funnel plot* da valina.

- Isoleucina

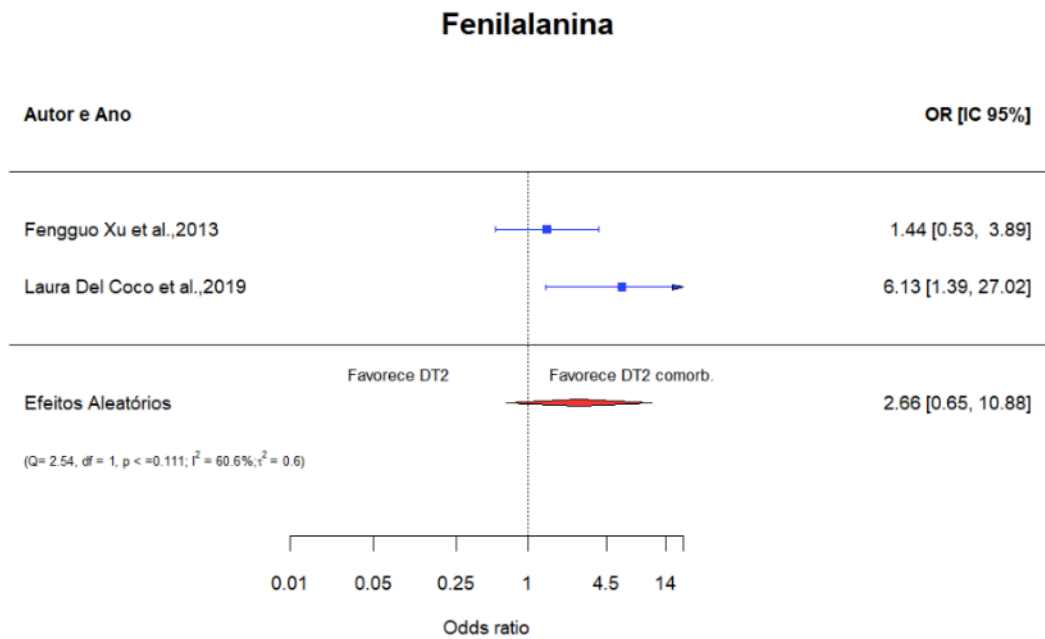


**Gráfico 29.** *Forest plot*: comparação dos OR e IC a 95% entre o grupo de indivíduos com DT2 e complicações (grupo experimental) e indivíduos com DT2, usando um modelo de efeito aleatórios para a isoleucina.

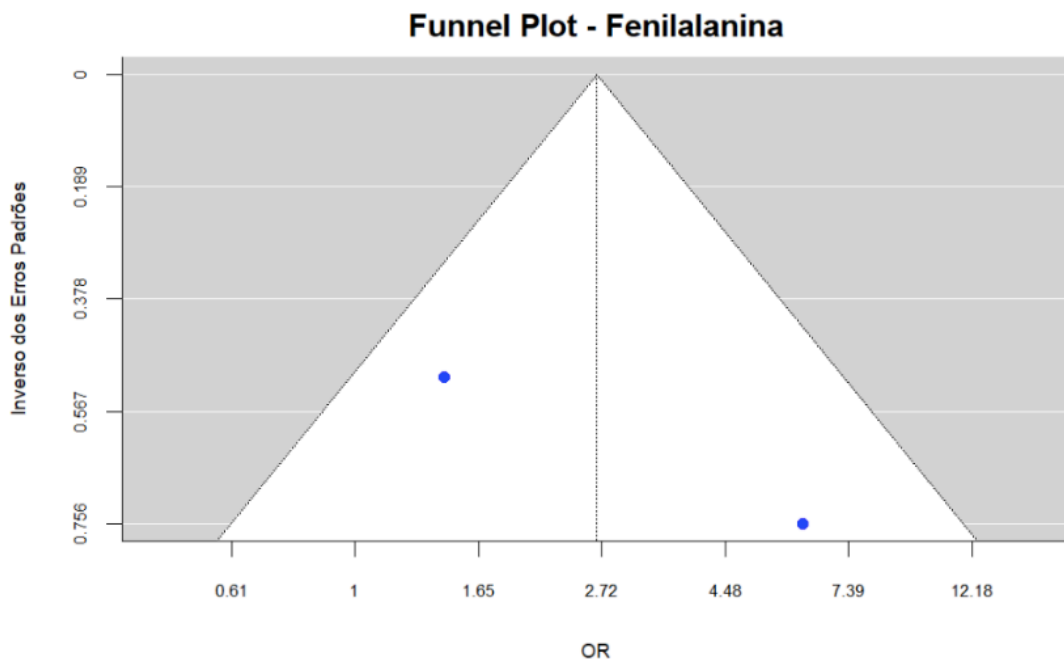


**Gráfico 30.** *Funnel plot* da isoleucina.

- Fenilalanina

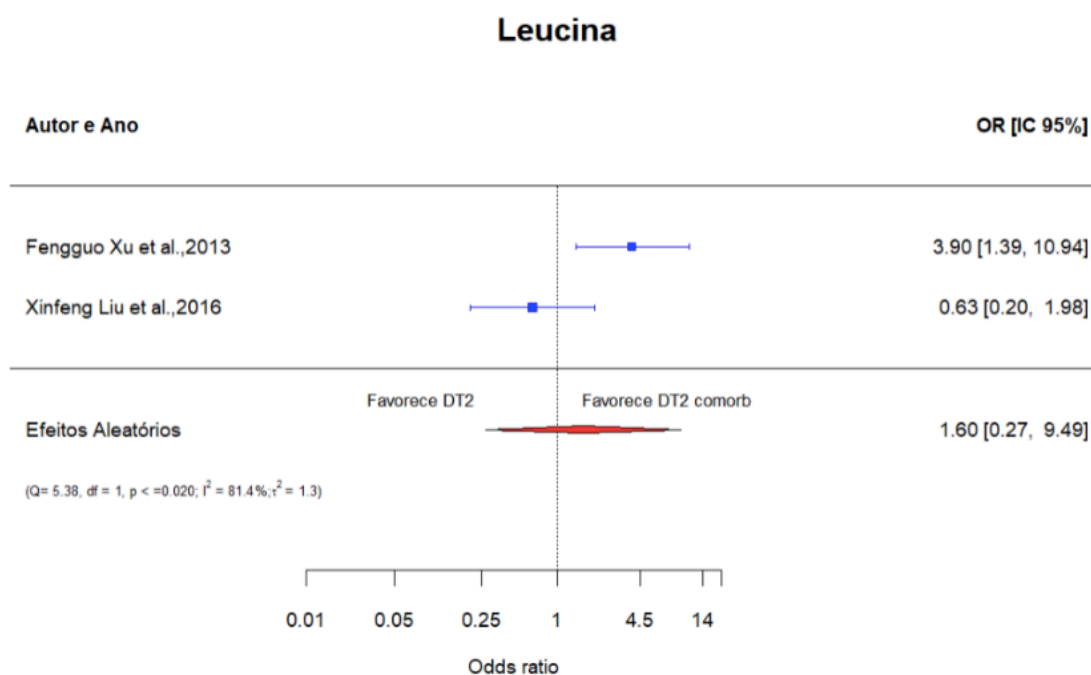


**Gráfico 31.** *Forest plot*: comparação dos OR e IC a 95% entre o grupo de indivíduos com DT2 e complicações (grupo experimental) e indivíduos com DT2, usando um modelo de efeito aleatórios para a fenilalanina.

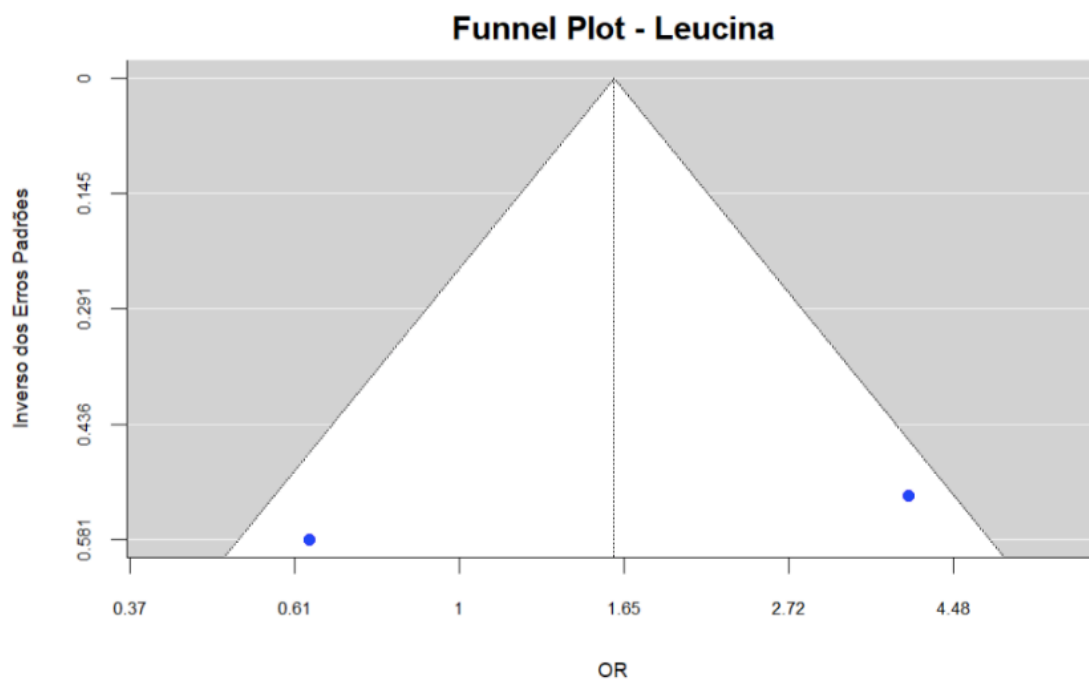


**Gráfico 32.** *Funnel plot* da fenilalanina.

- Leucina



**Gráfico 33.** *Forest plot*: comparação dos OR e IC a 95% entre o grupo de indivíduos com DT2 e complicações (grupo experimental) e indivíduos com DT2, usando um modelo de efeito aleatórios para a leucina.

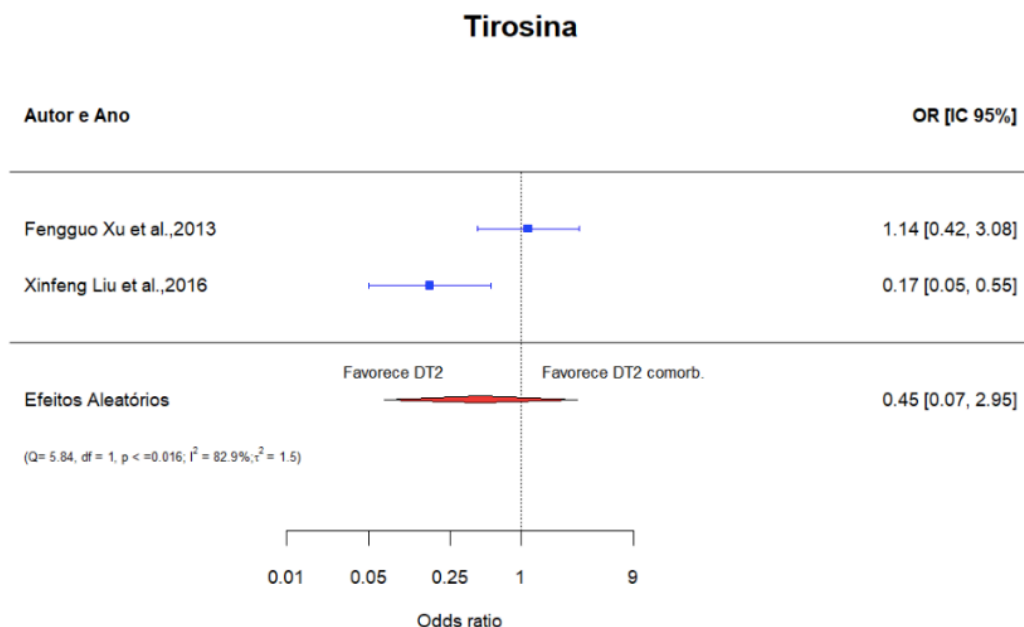


**Gráfico 34.** *Funnel plot* da leucina.

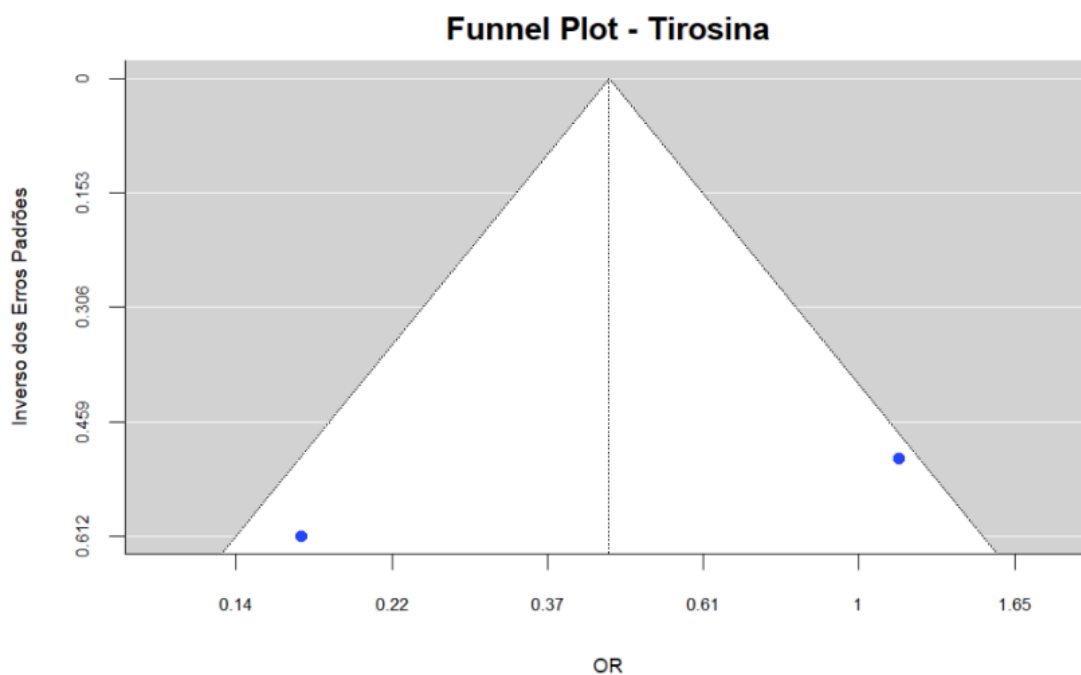
- Interpretação de resultados: valina, isoleucina, fenilalanina e leucina

Pela observação dos *forest plot* pode perceber-se que estes metabolitos estão em maior concentração no grupo de indivíduos com DT2 e outras complicações; representando um risco acrescido para desenvolver complicações associadas à patologia de base; porém o número de estudos incluídos é muito baixo, apresentando elevada heterogeneidade e na sua maioria, elevados intervalos de confiança, tornando-os não significativos. Também quando observados os *funnel plot* verifica-se que há dispersão dos resultados indicando viés de publicação.

- Tirosina

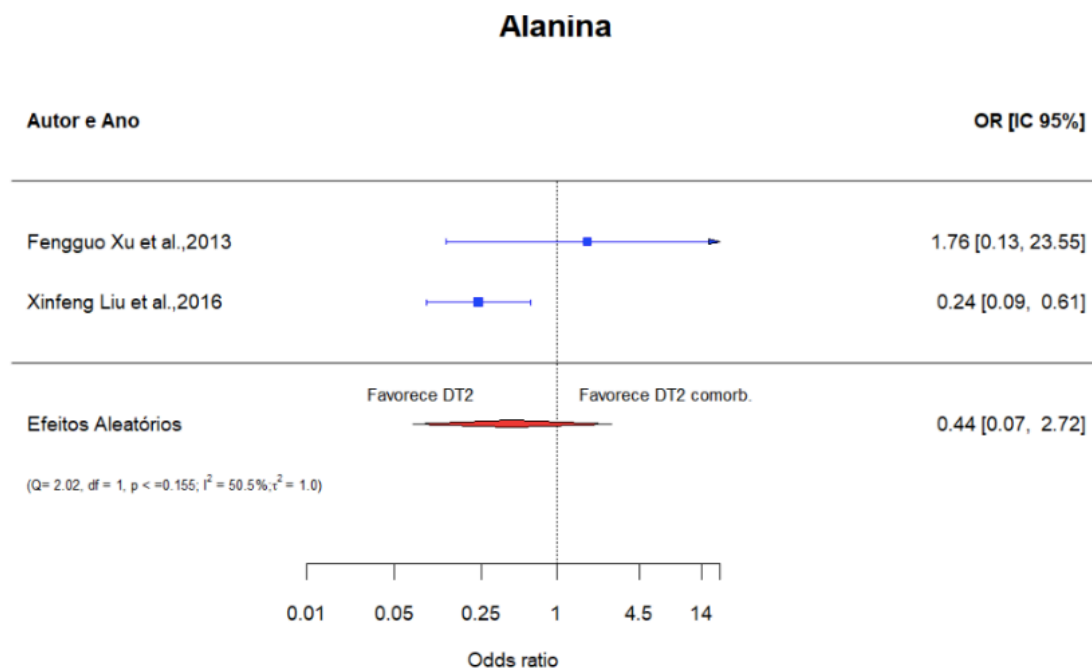


**Gráfico 35.** *Forest plot*: comparação dos OR e IC a 95% entre o grupo de indivíduos com DT2 e complicações (grupo experimental) e indivíduos com DT2, usando um modelo de efeito aleatórios para a tirosina.

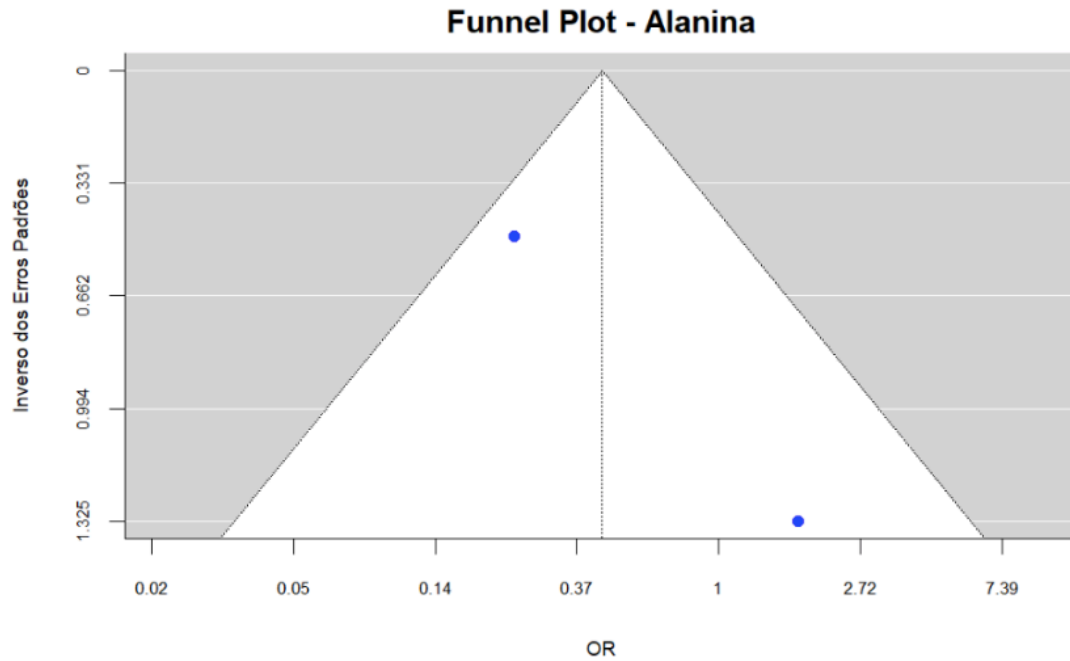


**Gráfico 36.** *Funnel plot* da tirosina.

- Alanina



**Gráfico 37.** *Forest plot*: comparação dos OR e IC a 95% entre o grupo de indivíduos com DT2 e complicações (grupo experimental) e indivíduos com DT2, usando um modelo de efeito aleatórios para a alanina.



**Gráfico 38.** *Funnel plot* da tirosina.

- Interpretação dos resultados: tirosina e alanina

Pela observação dos *forest plot* destes dois metabolitos pode verificar-se que estes estão presentes em menor concentração nos indivíduos que apresentam complicações além da DT2. No caso da tirosina os dados são suportados por estudos com amostras de dimensões reduzidas, com elevado erro padrão. Os estudos incluídos não apresentam efeito global significativo. Em respeito ao viés de publicação, é também elevado.

## 5. Discussão

Este capítulo inicia-se com uma análise dos *outcomes* provenientes da meta-análise relacionando-os com a análise efetuada na revisão sistemática da literatura. Depois, no racional, são apresentados alguns aspetos teóricos que contribuem para a compreensão dos resultados obtidos.

São também referidas algumas limitações metodológicas do estudo e sugeridas considerações para estudos futuros.

### 5.1. *Outcomes* dos metabolitos analisados

#### 5.1.1. Diabetes tipo 2 *versus* controlo

Comparando os resultados obtidos na meta-análise com os resultados da revisão sistemática da literatura, verifica-se que há concordância em 78% dos metabolitos analisados.<sup>61,63-67</sup> Verificou-se que a valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina e glicerol estão aumentados em indivíduos com DT2, podendo representar um risco aumentado de desenvolver a patologia. Por outro lado, a lisina foi encontrada em menores concentrações plasmáticas nos indivíduos com diabetes tipo 2, pelo que parece ser um fator protetor da doença. Estes achados estão de acordo com a literatura recente.<sup>65,67,68</sup>

Todavia, para 22% dos metabolitos analisados não foram obtidos resultados concordantes entre a meta-análise e a revisão sistemática.<sup>61,65,67,68</sup> Entre estes, salientam-se os resultados da glicina provenientes da meta-análise que indicam que a sua concentração encontra-se aumentada nos doentes com diabetes, representando um risco aumentado para desenvolver a doença. Outro metabolito para o qual se obteve resultados discordantes entre a revisão sistemática e a meta-análise foi a alanina. Os resultados obtidos na meta-análise indicam que se encontra diminuída nos indivíduos com DT2 sugerindo um efeito protetor. Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura.<sup>64,65,76</sup> Embora a maioria dos estudos considerados para a revisão sistemática mostrem que a alanina se encontra em concentrações mais elevadas na DT2, existem outros estudos que indicam que este metabolito está presente em concentrações mais baixas. Este resultado pode dever-se ao fato que nem todos os estudos analisados na revisão sistemática foram incluídos na meta-análise.

Apesar de haver alguma concordância entre os resultados obtidos e o descrito atualmente na literatura, é de notar que a maioria dos resultados não permite inferir associações significativas com o risco de desenvolver a doença. À exceção da leucina, alanina e glicina.

Embora neste trabalho a revisão sistemática e vários autores observem concentrações baixas de glicina<sup>62,64,76</sup> em doentes com diabetes tipo 2, após o estudo da meta-análise o

resultado obtido indica o contrário. Esta divergência pode ser resultante do viés de publicação observado. O mesmo se aplica à alanina. O viés de publicação observado em ambos os casos poderá ser resultado da inclusão de indivíduos em diferentes faixas etárias, diferentes intervalos de tempo de diagnóstico da patologia, toma de fármacos para a DT2 ou para outras complicações.

O número baixo de estudos disponíveis e a frequente ausência de dados, nomeadamente idade e tempo do diagnóstico e toma de fármacos, não permitiu realizar um estudo de meta-análise por subgrupos, o que seria o mais adequado. Apesar do enviesamento dos resultados obtidos, os metabolitos leucina, alanina e glicina, mostraram que talvez possam estar relacionados com a patogénese da DT2, uma vez que os resultados estatísticos destes metabolitos são significativos.

### **5.1.2. Diabetes tipo 2 com complicações *versus* diabetes tipo 2**

Dos artigos elegíveis para este trabalho, apenas um número bastante reduzido (10 artigos) era dirigido às complicações associadas à DT2.

Muitos dos estudos apresentavam alguma variabilidade nas características dos participantes, nomeadamente a idade. Isto é, no mesmo estudo havia a coexistência de participantes de faixas etárias diferentes; o que, possivelmente se traduz na variabilidade do decurso da patologia apresentada pelos participantes. Este fator poderá ter contribuído para o viés dos resultados. Embora se possa especular que participantes com maior tempo de decorrência da doença apresentem também complicações associadas, estas não foram referidas pela maioria dos autores.

Ao comparar os resultados obtidos na meta-análise com os resultados provenientes da revisão sistemática e literatura recente, verificaram-se algumas diferenças nos resultados dos metabolitos analisados.<sup>64,82,90</sup> A meta-análise realizada indica que os metabolitos, valina, isoleucina, fenilalanina e leucina estão aumentados em indivíduos com diabetes tipo 2 com complicações, podendo representar um risco acrescido de desenvolver complicações associadas à DT2. Estes resultados estão em oposição ao descrito por vários autores que sugerem que estes metabolitos estão presentes em menores concentrações na presença de doenças associadas à DT2<sup>64,82</sup>. Em relação à tirosina e alanina a meta-análise indica que estes metabolitos se encontram em menores concentrações em indivíduos com complicações associadas à DT2, pelo que poderão representar um fator protetor para o desenvolvimento de complicações decorrentes da DT2. Estes resultados estão de acordo com outros autores.<sup>64,82</sup>

No entanto, os resultados obtidos provêm sobretudo de estudos heterogêneos, intervalos de confiança com margens de erro elevadas, conduzindo a estimativas com baixa precisão.

Também estes resultados provêm da análise de estudos com elevado viés de publicação e tal como referido anteriormente, o viés pode ser resultante da elevada

heterogeneidade dos grupos e da impossibilidade de um estudo de meta-análise por subgrupos.

## 5.2. Racional

Foi efetuada uma revisão sistemática e meta-análise com o intuito de sumarizar a informação disponível sobre potenciais biomarcadores metabólicos para o diagnóstico da DT2 e das suas complicações em humanos.

Os metabolitos identificados com associação à DT2 foram, na sua maioria, aminoácidos.

As alterações obtidas incidiram em aminoácidos de cadeia ramificada e de aminoácidos aromáticos. De facto, vários metabolitos foram observados nos 45 estudos analisados. Destes, evidenciaram-se os aminoácidos e o glicerol como estando associados à diabetes, quer representando um risco ou uma proteção no que diz respeito ao desenvolvimento desta patologia. A valina, leucina, isoleucina, tirosina, fenilalanina, glicerol e glicina apresentaram concentrações plasmáticas aumentadas na DT2 enquanto que a lisina e a alanina surgiam diminuídas. Os resultados obtidos neste estudo estão em acordo com outros estudos, nomeadamente em meta-análises realizadas por outros autores.<sup>61,62,66,69</sup>

Vários estudos identificam a tríade de aminoácidos ramificados (BCAA, do inglês *branched chain amino acids*) valina, isoleucina e leucina como metabolitos positivamente associados à DT2.<sup>61-69</sup> Casey M. Rebholz e os seus colegas verificaram que os níveis séricos aumentados destes três BCAA estão associados a um risco aumentado de desenvolver DT2.<sup>66</sup> Esta associação prevaleceu estatisticamente significativa mesmo depois de ajustarem para a glicemia basal.

Em 2011 o estudo *Framingham Offspring Study* reportou que níveis elevados de BCAA (leucina, valina e isoleucina) e aminoácidos aromáticos (tirosina e fenilalanina) foram capazes de prever um risco aumentado de diabetes até 12 anos antes do início da doença.<sup>69,70</sup> Yonghai Lu *et al.* encontraram associações positivas entre os três aminoácidos (leucina, valina e isoleucina) e o risco aumentado de desenvolver diabetes durante o acompanhamento de 6 anos.<sup>69</sup> Outros autores concluem que níveis alterados de BCAA são um forte indicador de intolerância à glicose e resistência à insulina.<sup>61</sup>

Apesar das evidências apoiarem que níveis mais elevados de BCAA estão associados à DT2, os seu mecanismos permanecem por determinar.

São várias as hipóteses para explicar a etiologia da DT2 associada ao níveis alterados de BCAA.

Um dos mecanismos propostos é que a leucina activa o mTORC1 (do inglês *mammalian target of rapamycin complex 1*) e a proteína S6K1 (*Ribosomal protein S6 kinase beta-1*) levando à fosforilação da serina nas proteínas IRS1 e IRS2 (*Insulin receptor substrate 1 and 2*) resultando em resistência à insulina.<sup>69,72,73</sup>

Outra hipótese é de que o metabolismo dos BCAA contribua para uma acumulação de intermediários tóxicos, nomeadamente através da ação do complexo enzimático  $\alpha$ -cetoácido de cadeia ramificada, durante o seu catabolismo, levando à disfunção da mitocôndria nas células beta e promovendo resistência à insulina.<sup>74,77</sup>

Estudos de randomização mendeliana sustentam a hipótese de que o metabolismo dos BCAA podem ter um papel causal na etiologia da DT2.<sup>75</sup>

Outros autores, apoiados em estudos de randomização mendeliana, sugerem que a adiposidade e a resistência à insulina levam a níveis elevados de BCAA.<sup>61</sup>

Por outro lado, os níveis elevados de metabolitos de BCAA, quer pela diminuição do seu catabolismo ou pelo aumento da degradação de proteínas dos tecidos conduzem à resistência à insulina e à diabetes.<sup>76</sup>

Está demonstrado que o exercício físico melhora a sensibilidade à insulina pela promoção do catabolismo dos BCAA no músculo esquelético.<sup>77</sup>

Todas estas evidências levam a crer que níveis aumentados de BCAA possam ser indicativos precoces para o desenvolvimento de DT2 pelo que podem constituir biomarcadores da doença.

Gaukun Qiu e os colegas identificaram a associação entre a alanina, fenilalanina e tirosina com o risco futuro de desenvolver DT2.<sup>65</sup>

No que diz respeito à alanina e à lisina os resultados da meta-análise mostram que se encontram concentrações plasmáticas mais baixas na DT2. A alanina é um aminoácido não essencial, produzido pelo corpo humano estando presente em elevadas concentrações no músculo, sendo de extrema importância uma vez que a sua libertação serve como fonte de energia.<sup>64</sup>

Os níveis de alanina relacionam-se com os níveis da glicemia, quer na diabetes quer na hipoglicémia.<sup>64,71</sup> Pelo que este aminoácido desempenha um papel importante como regulador no metabolismo da glicose.<sup>65,71,78</sup>

A alanina é o aminoácido predominantemente catabolizado pelo fígado e é o maior precursor para a gliconeogénese. Vários estudos referem que o metabolismo da alanina no fígado pode ter um papel importante no estado de hiperglicemia na DT2,<sup>78</sup> outros estudos transversais<sup>79</sup> e prospetivos<sup>80</sup> fazem a correlação entre a alanina circulante e alterações na sensibilidade à insulina.

Okun *et al.* verificou que a expressão das enzimas catabólicas da alanina hepática (as duas isomorfias da alanina aminotransferase - ALT) está aumentada no fígado de ratinhos obesos com DT2 e em humanos com DT2 e cuja supressão retarda a hiperglicemia.<sup>78</sup> Xinfeng Liu *et al.* reporta resultados semelhantes indicando que a metabolização de alanina é superior em doentes com DT2<sup>64</sup> ilustrando o aumento da gliconeogénese. A elevada atividade enzimática pode explicar a baixa concentração de alanina sérica verificada por vários autores, pelo que pode estar associada a uma maior utilização no fígado para produção de glicose.

Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que identificaram que níveis baixos de alanina no sangue estão consistentemente relacionados com o risco aumentado de desenvolver DT2.<sup>82</sup>

No que diz respeito aos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, estão envolvidos na biossíntese de proteínas, e frequentemente são referidos como apresentando relação

positiva com a DT2.<sup>65</sup> Outros autores concluíram também que estes dois aminoácidos podem estar concatenados ao desenvolvimento de resistência à insulina.<sup>72,80</sup>

A tirosina é um aminoácido não essencial, o que significa que o corpo tem a capacidade de o produzir, geralmente a partir da fenilalanina (aminoácido essencial).<sup>71</sup> É importante mencionar que pode existir uma correlação entre os níveis de tirosina circulante e várias complicações decorrentes da DT2,<sup>82,83</sup> como por exemplo, nefropatia<sup>84</sup> e retinopatia.<sup>85</sup> Contudo, Clara Barrios *et al.* remete para o facto de que apesar do aumento da concentração da fenilalanina estar associada a uma pior função renal em indivíduos com diabetes e sem diabetes, este aminoácido, não é preditivo da progressão da doença, sugerindo que o aumento da concentração da fenilalanina seja uma consequência da disfunção renal.<sup>90</sup> Num outro estudo levado a cabo por Hui-Huan Luo *et al.* onde explora as relações entre a fenilalanina e a tirosina na retinopatia diabética, conclui que a baixa concentração plasmática quer de fenilalanina quer de tirosina depende de outro fator de risco, a disfunção renal, e que apenas os doentes que apresentassem concentrações baixas dos dois aminoácidos corriam o risco aumentado de desenvolver retinopatia diabética. As baixas concentrações de fenilalanina e tirosina atuam de forma independente mas sinérgica no desenvolvimento de retinopatia diabética. A presença de nefropatia diabética potencia as baixas concentrações de fenilalanina e tirosina.<sup>85</sup>

Por sua vez, a lisina é um metabolito primário, não aromático sendo essencial fisiológica ou metabolicamente.<sup>71</sup> Alguns estudos referem que a lisina pode estar implicada na DT2. Foi observada uma interação entre níveis mais elevados de lisina basal e a DT2 no risco de desenvolver DCV.<sup>82</sup> Derivados da lisina, concretamente o N<sup>ε</sup>-(1-carboxymethyl)-L-Lysine, em concentrações aumentadas foram detetados em doentes com DT2 e em doentes com disfunção renal.<sup>86</sup>

A glicina, por sua vez, é um aminoácido alifático (a sua cadeia lateral é composta por hidrocarbonetos saturados) e pertence ao grupo dos aminoácidos proteinogénicos.<sup>71</sup> É um metabolito importante na regulação metabólica, na função neurológica e reações anti-oxidativas.<sup>69,87</sup> A glicina é sintetizada a partir da serina no fígado pela enzima glicina sintetase. A serina é convertida em glicose essencialmente à custa da conversão em piruvato pela desaminação catalisada pela serina desidratase. Por fim, o piruvato é convertido em glicose pela gluconeogénese. Estudos referem o aumento da serina em DT2 levando a considerar que um aumento da atividade da via glicina-serina-glicose pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da DT2.<sup>88</sup>

Outro fator a ter em consideração é o aumento frequentemente observado de glicina em nefropatia diabética e não diabética. A glicina é convertida em serina nos rins. Num quadro de disfunção renal verifica-se um aumento da concentração da glicina podendo levar a associações erradas. Assim, torna-se essencial aquando do estudo da DT2 incluir a disfunção renal como cofator.<sup>89,90</sup>

O glicerol é um componente importante dos triglicéridos e dos fosfolípidos estando armazenado nos adipócitos. Para além dos aminoácidos, também o glicerol é uma molécula intermediária importante quer no metabolismo dos lípidos quer dos glúcidos.<sup>93</sup> Este pode ser

convertido num intermediários da gluconeogénese levando à formação da glicose pelo fígado a fim de produzir energia para o metabolismo celular.

Estudos populacionais mostram que o aumento da concentração de glicerol plasmático está correlacionado tanto com o desenvolvimento da hiperglicemia como da DT2.<sup>91,93</sup>

Está demonstrado que a concentração aumentada de glicerol no plasma relaciona-se com o tecido adiposo. No caso da DT2, a resistência à insulina no tecido adiposo resulta em alterações na cascata de sinalização da insulina que conduz à incapacidade de armazenar os triglicéridos nos adipócitos. Esta incapacidade leva a uma libertação abrupta de ácidos gordos livres e glicerol.<sup>92</sup>

Vários autores descrevem a correlação dos níveis de glicerol no plasma com a DT2.<sup>63,66,69,90</sup> Outros referem que alterações metabólicas relacionadas com a lipólise podem servir como biomarcadores, sugerindo que estes estão presentes muito antes do início da DT2.<sup>66</sup>

### **5.3. Limitações**

Como limitações do presente estudo aponta-se a heterogeneidade dos nomes dos metabolitos mencionados nos artigos incluídos no estudo. É de notar que esta variabilidade no nome do metabolito pode ter tido impacto na contagem dos mesmos, uma vez que a contagem foi efetuada por igualdade de palavras.

Assume-se que o erro é residual uma vez que a grande maioria dos autores reporta o metabolito pelo nome IUPAC.

Uma outra limitação é o facto de haver poucos artigos que comparem a DT2 com a DT2 com complicações, refletindo-se na robustez da meta-análise onde, embora o número mínimo de artigos seja 2, não é o ideal para analisar a variabilidade dos resultados.

## 6. Conclusões

Perante os números atuais de incidência da DT2, são de grande interesse os estudos na área da metabolómica. Estes estudos permitem a identificação de pequenas moléculas que podem estar associadas à patogénese da doença, podendo vir a tornarem-se cruciais como biomarcadores para um diagnóstico precoce.

O presente trabalho teve como objetivo principal identificar metabolitos que pudessem estar relacionados com a patogénese da DT2 mas também com as complicações que geralmente estão associadas à patologia de base.

A revisão sistemática e meta-análise constituem uma ferramenta valiosa para este tipo de investigação ao permitir sumariar os resultados obtidos em inúmeros estudos, previamente desenvolvidos, de forma a encontrar uma resposta à pergunta de investigação. Neste contexto, este trabalho baseia os seus resultados em estudos prévios que envolveram, no seu conjunto, mais de 30 mil participantes.

Após a análise dos estudos considerados, verificou-se que os metabolitos frequentemente reportados pelos autores, como possíveis marcadores da DT2, e com resultados estatisticamente significativos, são os aminoácidos leucina, alanina e glicina. O que sugere que estas moléculas possam ser eventualmente consideradas como biomarcadores para a DT2.

Em relação às complicações associadas à DT2 a maioria dos estudos considerados indicam que, de forma geral, há uma diminuição da concentração dos metabolitos analisados comparativamente a indivíduos com DT2 e sem complicações. A meta-análise produzida neste trabalho indica que tanto a tirosina como a alanina estão presentes em concentrações mais baixas nos indivíduos com complicações, o que está de acordo com a literatura recente. Em contrapartida, a meta-análise aponta que os aminoácidos valina, isoleucina, fenilalanina e leucina estão tendencialmente aumentados em indivíduos com complicações associada à DT2. Estes resultados sugerem que estas moléculas possam constituir um fator de risco para o desenvolvimento de complicações, pelo que poderão ser consideradas como possíveis marcadores para o desenvolvimento de outras complicações decorrentes da DT2.

Nas últimas décadas, o interesse pela metabolómica aplicada à DT2 tem aumentado sendo estes estudos de extrema importância pela vantagem que apresentam, podendo permitir um diagnóstico precoce para uma patologia epidémica associada a várias complicações; principais responsáveis pela morbilidade e mortalidade associadas à DT2. Contudo, os resultados produzidos têm frequentemente subjacente algum viés de publicação.

Apesar de existirem alguns estudos semelhantes dirigidos à retinopatia, este trabalho foi original pois não existe nenhum estudo semelhante.

Este trabalho é importante uma vez que abrange resultados decorrentes de um grande número de participantes, indica algumas moléculas que poderão ser consideradas como

possíveis biomarcadores para a DT2 e para as suas complicações e mostra a importância e a necessidade deste tipo de estudo na área da metabolómica dirigida à DT2.

Embora existam vários estudos nesta área, os dados disponíveis atualmente não nos permitem identificar com rigor metabolitos associados à DT2, uma vez que os estudos publicados nesta área apresentam grande heterogeneidade, viés de publicação e na maioria dos casos, não são significativos, comprometendo a análise dos dados.

É, por isso, fundamental que mais estudos sejam efetuados, sendo de extrema importância que o desenho dos estudos seja adequado ao grupo de indivíduos que se está a estudar.

Como considerações para estudos futuros, os estudos primários realizados devem ter especial atenção às características dos participantes, quer do grupo experimental quer do controlo, aspetos como a idade, idade e decurso da patologia e medicação administrada devem ser tidos em consideração. O tratamento dos dados deve ser então efetuado com recurso a subgrupos.

Para estudos primários seria importante incidir em determinados conjuntos de metabolitos, como por exemplo os BCAA, com a premissa de aprofundar mais a pesquisa e o conhecimento sobre os mecanismos subjacentes que relacionam esta classe de aminoácidos com a DT2. Existem várias evidências de que estes metabolitos poderão ser preditivos da doença, contudo é necessário um conhecimento mais aprofundado que dê racionalidade científica e valide estes metabolitos como biomarcadores.

Em suma, mais estudos são necessários para contribuir para este conhecimento.

## 7. Referências bibliográficas

1. International Diabetes Federation (2022). *IDF Diabetes Atlas*. Belgica: IFD. Recuperado em Fevereiro 7, 2022 a partir de <https://diabetesatlas.org>
2. World Health Organization (2021). *Diabetes*. Suíça: WHO. Recuperado em Fevereiro 7, 2022 a partir de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
3. Abbasi, A., Peelen, L. M., Corpeleijn, E., van der Schouw, Y. T., Stolk, R. P., Spijkerman, A. M. W., van der A, D. L., Moons, K. G. M., Navis, G., Bakker, S. J. L., & Beulens, J. W. J. (2012). Prediction models for risk of developing type 2 diabetes: Systematic literature search and independent external validation study. *BMJ*, *345*(sep18 2), e5900–e5900. <https://doi.org/10.1136/bmj.e5900>
4. Zheng, Y., Ley, S. H., & Hu, F. B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*, *14*(2), 88–98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>
5. O’Connell, J. M., & Manson, S. M. (2019). Understanding the Economic Costs of Diabetes and Prediabetes and What We May Learn About Reducing the Health and Economic Burden of These Conditions. *Diabetes Care*, *42*(9), 1609–1611. <https://doi.org/10.2337/dci19-0017>
6. Kahn, S. E., Hull, R. L., & Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, *444*(7121), 840–846
7. Higgins, J. P. T., & Cochrane Collaboration (Eds.). (2020). *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions* (Second edition). Wiley-Blackwell
8. Borenstein, M. (Ed.). (2009). *Introduction to meta-analysis*. John Wiley & Sons
9. Apifarma - Associação Portuguesa da Indústria Farmacêutica (2020). *O valor diagnóstico para o sistema de saúde e para o cidadão: o caso da diabetes*. Lisboa: apitaram. Recuperado em Fevereiro 7, 2022 a partir de [https://www.apifarma.pt/wp-content/uploads/2019/02/Brochura\\_OValorDoDiagnostico\\_Diabetes\\_30Jan20.pdf](https://www.apifarma.pt/wp-content/uploads/2019/02/Brochura_OValorDoDiagnostico_Diabetes_30Jan20.pdf)

10. Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal (2019). *Relatório anual do observatório nacional da Diabetes - 2019*. Lisboa: APDP. Recuperado em Junho 18, 2022 a partir de <https://apdp.pt/publicacoes/relatorio-anual-do-observatorio-nacional-da-diabetes-2019/>
11. Smyth, S., & Heron, A. (2006). Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nature medicine*, 12(1), 75–80. <https://doi.org/10.1038/nm0106-75>
12. Neuenschwander, M., Ballon, A., Weber, K. S., Norat, T., Aune, D., Schwingshackl, L., & Schlesinger, S. (2019). Role of diet in type 2 diabetes incidence: Umbrella review of meta-analyses of prospective observational studies. *BMJ*, l2368. <https://doi.org/10.1136/bmj.l2368>
13. Chatterjee, S., Khunti, K., & Davies, M. J. (2017). Type 2 diabetes. *The Lancet*, 389(10085), 2239–2251. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30058-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30058-2)
14. Klein, M. S., & Shearer, J. (2016). Metabolomics and Type 2 Diabetes: Translating Basic Research into Clinical Application. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/3898502>
15. Fonseca, V., Chou, E., Chung, H. W., & Gerrits, C. (2017). Economic burden of hypoglycemia with basal insulin in type 2 diabetes. *The American journal of managed care*, 23(2), 114–122
16. Fuchsberger, C., Flannick, J., Teslovich, T. M., Mahajan, A., Agarwala, V., Gaulton, K. J., Ma, C., Fontanillas, P., Moutsianas, L., McCarthy, D. J., Rivas, M. A., Perry, J., Sim, X., Blackwell, T. W., Robertson, N. R., Rayner, N. W., Cingolani, P., Locke, A. E., Tajes, J. F., Highland, H. M., ... McCarthy, M. I. (2016). The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature*, 536(7614), 41–47. <https://doi.org/10.1038/nature18642>
17. Dimas, A. S., Lagou, V., Barker, A., Knowles, J. W., Mägi, R., Hivert, M. F., Benazzo, A., Rybin, D., Jackson, A. U., Stringham, H. M., Song, C., Fischer-Rosinsky, A., Boesgaard, T. W., Grarup, N., Abbasi, F. A., Assimes, T. L., Hao, K., Yang, X., Lecoeur, C., Barroso, I., ... MAGIC Investigators (2014). Impact of type 2 diabetes susceptibility variants on quantitative glycemic traits reveals mechanistic heterogeneity. *Diabetes*, 63(6), 2158–2171. <https://doi.org/10.2337/db13-0949>
18. Schellenberg, E. S., Dryden, D. M., Vandermeer, B., Ha, C., & Korownyk, C. (2013). Lifestyle interventions for patients with and at risk for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Annals of internal medicine*, 159(8), 543–551. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-159-8-201310150-00007>

19. Carruth, L., & Mendenhall, E. (2018). Social aetiologies of type 2 diabetes. *BMJ (Clinical research ed.)*, 361, k1795. <https://doi.org/10.1136/bmj.k1795>
20. Cerf, M. E. (2013). Beta Cell Dysfunction and Insulin Resistance. *Frontiers in Endocrinology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00037>
21. Fu, Z., Gilbert, E. R., & Liu, D. (n.d.). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. 29
22. Halban, P. A. (1994). Proinsulin processing in the regulated and the constitutive secretory pathway. *Diabetologia*, 37(S2), S65–S72. <https://doi.org/10.1007/BF00400828>
23. Yamamoto, W. R., Bone, R. N., Sohn, P., Syed, F., Reissaus, C. A., Mosley, A. L., Wijeratne, A. B., True, J. D., Tong, X., Kono, T., & Evans-Molina, C. (2019). Endoplasmic reticulum stress alters ryanodine receptor function in the murine pancreatic  $\beta$  cell. *The Journal of biological chemistry*, 294(1), 168–181. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005683>
24. Rorsman, P., & Ashcroft, F. M. (2018). Pancreatic  $\beta$ -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiological reviews*, 98(1), 117–214. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2017>
25. Seino, S., Shibasaki, T., & Minami, K. (2011). Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 121(6), 2118–2125. <https://doi.org/10.1172/JCI45680>
26. Cuññas, A., García-Morales, V., Viña, D., Gil-Longo, J., & Campos-Toimil, M. (2016). Activation of PKA and Epac proteins by cyclic AMP depletes intracellular calcium stores and reduces calcium availability for vasoconstriction. *Life sciences*, 155, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.059>
27. Simon, J., Webb, T. E., & Barnard, E. A. (1995). Characterization of a P2Y purinoceptor in the brain. *Pharmacology & toxicology*, 76(5), 302–307. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1995.tb00151.x>
28. Valera, S., Hussy, N., Evans, R. J., Adami, N., North, R. A., Surprenant, A., & Buell, G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*, 371(6497), 516–519. <https://doi.org/10.1038/371516a0>

29. Halban, P. A., Polonsky, K. S., Bowden, D. W., Hawkins, M. A., Ling, C., Mather, K. J., Powers, A. C., Rhodes, C. J., Sussel, L., & Weir, G. C. (2014).  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *Diabetes care*, 37(6), 1751–1758. <https://doi.org/10.2337/dc14-0396>
30. Christensen, A.A.; Gannon, M. The Beta Cell in Type 2 Diabetes. *Curr. Diabetes Rep.* **2019**, 19, 81
31. Luciani, D. S., Gwiazda, K. S., Yang, T. L., Kalynyak, T. B., Bychkivska, Y., Frey, M. H., Jeffrey, K. D., Sampaio, A. V., Underhill, T. M., & Johnson, J. D. (2009). Roles of IP3R and RyR Ca<sup>2+</sup> channels in endoplasmic reticulum stress and beta-cell death. *Diabetes*, 58(2), 422–432. <https://doi.org/10.2337/db07-1762>
32. Islam M. S. (2002). The ryanodine receptor calcium channel of beta-cells: molecular regulation and physiological significance. *Diabetes*, 51(5), 1299–1309. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.5.1299>
33. Alejandro, E. U., Gregg, B., Blandino-Rosano, M., Cras-Méneur, C., & Bernal-Mizrachi, E. (2015). Natural history of  $\beta$ -cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Molecular aspects of medicine*, 42, 19–41. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2014.12.002>
34. Kelley, D. E., & Mandarino, L. J. (2000). Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes*, 49(5), 677–683. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.5.677>
35. Kelley D. E. (2005). Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything. *The Journal of clinical investigation*, 115(7), 1699–1702. <https://doi.org/10.1172/JCI25758>
36. Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2002). Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Cardiology*, 90(5), 11–18. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)02554-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)02554-7)
37. Pearson, T., Wattis, J. A., King, J. R., MacDonald, I. A., & Mazzatti, D. J. (2016). The Effects of Insulin Resistance on Individual Tissues: An Application of a Mathematical Model of Metabolism in Humans. *Bulletin of mathematical biology*, 78(6), 1189–1217. <https://doi.org/10.1007/s11538-016-0181-1>
38. Wilcox G. (2005). Insulin and insulin resistance. *The Clinical biochemist. Reviews*, 26(2), 19–39

39. Rodriguez-Saldana, J. (Ed.). (2019). *The diabetes textbook: Clinical principles, patient management and public health issues*. Springer
40. Hammoud, T., Tanguay, J. F., & Bourassa, M. G. (2000). Management of coronary artery disease: therapeutic options in patients with diabetes. *Journal of the American College of Cardiology*, *36*(2), 355-365
41. Colwell, J. A., Lopes-Virella, M., & Halushka, P. V. (1981). Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Diabetes care*, *4*(1), 121-133
42. Funk, S. D., Yurdagul, A., & Orr, A. W. (2012). Hyperglycemia and endothelial dysfunction in atherosclerosis: lessons from type 1 diabetes. *International journal of vascular medicine*, 2012
43. Meschia, J. F., Bushnell, C., Boden-Albala, B., Braun, L. T., Bravata, D. M., Chaturvedi, S., Creager, M. A., Eckel, R. H., Elkind, M. S., Fornage, M., Goldstein, L. B., Greenberg, S. M., Horvath, S. E., Iadecola, C., Jauch, E. C., Moore, W. S., Wilson, J. A., American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Clinical Cardiology, ... Council on Hypertension (2014). Guidelines for the primary prevention of stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, *45*(12), 3754–3832. <https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000046>
44. DGS-Direcção Geral de Saúde (2011). *NORMA da Direcção Geral de Saúde: Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus*. Lisboa: DGS. Recuperado em Fevereiro 17, 2022 a partir de <https://www.dgs.pt/programa-nacional-para-a-diabetes/circulares-normas-e-orientacoes/norma-da-direccao-geral-da-saude-n-0022011-de-14012011-pdf.aspx>
45. Kilpatrick, E. S., & Atkin, S. L. (2014). Using haemoglobin A1c to diagnose type 2 diabetes or to identify people at high risk of diabetes. *BMJ*, *348*(apr25 3), g2867–g2867. <https://doi.org/10.1136/bmj.g2867>
46. Califf, R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, *243*(3), 213–221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>
47. Chen, Z.-Z., & Gerszten, R. E. (2020). Metabolomics and Proteomics in Type 2 Diabetes. *Circulation Research*, *126*(11), 1613–1627. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.315898>

48. Oliver, S. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, 16(9), 373–378. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01214-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01214-1)
49. Nicholson, J. K. (2006). Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. *Molecular Systems Biology*, 2(1), 52. <https://doi.org/10.1038/msb4100095>
50. Zamboni, N., Saghatelian, A., & Patti, G. J. (2015). Defining the Metabolome: Size, Flux, and Regulation. *Molecular Cell*, 58(4), 699–706. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.021>
51. Jonsson, P., Johansson, E. S., Wuolikainen, A., Lindberg, J., Schuppe-Koistinen, I., Kusano, M., Sjöström, M., Trygg, J., Moritz, T., & Antti, H. (2006). Predictive metabolite profiling applying hierarchical multivariate curve resolution to GC-MS data—a potential tool for multi-parametric diagnosis. *Journal of proteome research*, 5(6), 1407–1414
52. Johnson, C. H., Ivanisevic, J., & Siuzdak, G. (2016). Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(7), 451–459. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.25>
53. Jacob, M., Lopata, A. L., Dasouki, M., & Abdel Rahman, A. M. (2019). Metabolomics toward personalized medicine. *Mass Spectrometry Reviews*, 38(3), 221–238. <https://doi.org/10.1002/mas.21548>
54. Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., & Fenn, J. B. (1985). Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical chemistry*, 57(3), 675–679. <https://doi.org/10.1021/ac00280a023>
55. Ozanne, S. E., Rahmoune, H., & Guest, P. C. (2017). Multiplex Biomarker Approaches in Type 2 Diabetes Mellitus Research. In P. C. Guest (Ed.), *Multiplex Biomarker Techniques* (Vol. 1546, pp. 37–55). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8_3)
56. Lambert, J. B., Mazzola, E. P., & Ridge, C. D. (2019). Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications, and experimental methods. John Wiley & Sons
57. Moka, D., Vorreuther, R., Schicha, H., Spraul, M., Humpfer, E., Lipinski, M., ... & Lindon, J. C. (1998). Biochemical classification of kidney carcinoma biopsy samples using magic-angle-spinning <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 17(1), 125-132

58. Gathungu, R. M., Kautz, R., Kristal, B. S., Bird, S. S., & Vouros, P. (2020). The integration of LC-MS and NMR for the analysis of low molecular weight trace analytes in complex matrices. *Mass Spectrometry Reviews*, 39(1–2), 35–54. <https://doi.org/10.1002/mas.21575>
59. PubMed - National Library of Medicine (2020). *Timeline*. Bethesda: PubMed. Recuperado de Novembro, 2020 a Fevereiro, 2021 a partir de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=type+2+diabetes+AND+%28%28metabolomic%29+OR+%28metabolome%29%29+NOT+%28%28type+1+diabetes%29+OR+%28gestational+diabetes%29%29&filter=years.2002-2020&timeline=expanded>
60. CASP - Critical Appraisal Skills Programme (2020). *CASP Checklists*. United Kingdom: CASP. Recuperado de Novembro 5, 2020 a partir de <https://casp-uk.net/casp-tools-checklists/>
61. Ahola-Olli, A. V., Mustelin, L., Kalimeri, M., Kettunen, J., Jokelainen, J., Auvinen, J., Puukka, K., Havulinna, A. S., Lehtimäki, T., Kähönen, M., Juonala, M., Keinänen-Kiukaanniemi, S., Salomaa, V., Perola, M., Järvelin, M.-R., Ala-Korpela, M., Raitakari, O., & Würtz, P. (2019). Circulating metabolites and the risk of type 2 diabetes: A prospective study of 11,896 young adults from four Finnish cohorts. *Diabetologia*, 62(12), 2298–2309. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-05001-w>
62. Ferrannini, E., Natali, A., Camastra, S., Nannipieri, M., Mari, A., Adam, K.-P., Milburn, M. V., Kastenmüller, G., Adamski, J., Tuomi, T., Lyssenko, V., Groop, L., & Gall, W. E. (2013). Early Metabolic Markers of the Development of Dysglycemia and Type 2 Diabetes and Their Physiological Significance. *Diabetes*, 62(5), 1730–1737. <https://doi.org/10.2337/db12-0707>
63. Gogna, N., Krishna, M., Oommen, A. M., & Dorai, K. (2015). Investigating correlations in the altered metabolic profiles of obese and diabetic subjects in a South Indian Asian population using an NMR-based metabolomic approach. *Molecular BioSystems*, 11(2), 595–606. <https://doi.org/10.1039/C4MB00507D>
64. Liu, X., Gao, J., Chen, J., Wang, Z., Shi, Q., Man, H., Guo, S., Wang, Y., Li, Z., & Wang, W. (2016). Identification of metabolic biomarkers in patients with type 2 diabetic coronary heart diseases based on metabolomic approach. *Scientific Reports*, 6(1), 30785. <https://doi.org/10.1038/srep30785>

65. Qiu, G., Zheng, Y., Wang, H., Sun, J., Ma, H., Xiao, Y., Li, Y., Yuan, Y., Yang, H., Li, X., Min, X., Zhang, C., Xu, C., Jiang, Y., Zhang, X., He, M., Yang, M., Hu, Z., Tang, H., ... Wu, T. (2016). Plasma metabolomics identified novel metabolites associated with risk of type 2 diabetes in two prospective cohorts of Chinese adults. *International Journal of Epidemiology*, 45(5), 1507–1516. <https://doi.org/10.1093/ije/dyw221>
66. Rebholz, C. M., Yu, B., Zheng, Z., Chang, P., Tin, A., Köttgen, A., Wagenknecht, L. E., Coresh, J., Boerwinkle, E., & Selvin, E. (2018). Serum metabolomic profile of incident diabetes. *Diabetologia*, 61(5), 1046–1054. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4573-7>
67. Shi, L., Brunius, C., Lehtonen, M., Auriola, S., Bergdahl, I. A., Rolandsson, O., Hanhineva, K., & Landberg, R. (2018). Plasma metabolites associated with type 2 diabetes in a Swedish population: A case–control study nested in a prospective cohort. *Diabetologia*, 61(4), 849–861. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4521-y>
68. Xu, F., Tavintharan, S., Sum, C. F., Woon, K., Lim, S. C., & Ong, C. N. (2013). Metabolic Signature Shift in Type 2 Diabetes Mellitus Revealed by Mass Spectrometry-based Metabolomics. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(6), E1060–E1065. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-4132>
69. Lu, Y., Wang, Y., Ong, C.-N., Subramaniam, T., Choi, H. W., Yuan, J.-M., Koh, W.-P., & Pan, A. (2016). Metabolic signatures and risk of type 2 diabetes in a Chinese population: An untargeted metabolomics study using both LC-MS and GC-MS. *Diabetologia*, 59(11), 2349–2359. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4069-2>
70. Wang, T. J., Larson, M. G., Vasan, R. S., Cheng, S., Rhee, E. P., McCabe, E., Lewis, G. D., Fox, C. S., Jacques, P. F., Fernandez, C., O'Donnell, C. J., Carr, S. A., Mootha, V. K., Florez, J. C., Souza, A., Melander, O., Clish, C. B., & Gerszten, R. E. (2011). Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nature Medicine*, 17(4), 448–453. <https://doi.org/10.1038/nm.2307>
71. HMDB-The human Metabolome Database (2021). Canadá. HMDB. Recuperado em Fevereiro 8, 2022 a partir de <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000883>
72. Newgard, C. B., An, J., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Stevens, R. D., Lien, L. F., Haqq, A. M., Shah, S. H., Arlotto, M., Slentz, C. A., Rochon, J., Gallup, D., Ilkayeva, O., Wenner, B. R., Yancy, W. S., Jr, Eisenson, H., Musante, G., Surwit, R. S., Millington, D. S., Butler, M. D., ... Svetkey, L. P. (2009). A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell metabolism*, 9(4), 311–326

73. Melnik, B. C. (2012). Leucine signaling in the pathogenesis of type 2 diabetes and obesity. *World Journal of Diabetes*, 3(3), 38. <https://doi.org/10.4239/wjd.v3.i3.38>
74. Lynch, C. J., & Adams, S. H. (2014). Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nature reviews. Endocrinology*, 10(12), 723–736. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.171>
75. Lotta LA, Scott RA, Sharp SJ *et al* (2016) Genetic predisposition to an impaired metabolism of the branched-chain amino acids and risk of type 2 diabetes: a Mendelian randomisation analysis. *PLoS Med* 13(11):e1002179
76. Yu, D., Moore, S. C., Matthews, C. E., Xiang, Y.-B., Zhang, X., Gao, Y.-T., Zheng, W., & Shu, X.-O. (2016). Plasma metabolomic profiles in association with type 2 diabetes risk and prevalence in Chinese adults. *Metabolomics*, 12(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0890-8>
77. Shimomura, Y., Murakami, T., Nakai, N., Nagasaki, M., & Harris, R. A. (2004). Exercise Promotes BCAA Catabolism: Effects of BCAA Supplementation on Skeletal Muscle during Exercise. *The Journal of Nutrition*, 134(6), 1583S-1587S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.6.1583S>
78. Okun, J. G., Rusu, P. M., Chan, A. Y., Wu, Y., Yap, Y. W., Sharkie, T., Schumacher, J., Schmidt, K. V., Roberts-Thomson, K. M., Russell, R. D., Zota, A., Hille, S., Jungmann, A., Maggi, L., Lee, Y., Blüher, M., Herzig, S., Keske, M. A., Heikenwalder, M., ... Rose, A. J. (2021). Liver alanine catabolism promotes skeletal muscle atrophy and hyperglycaemia in type 2 diabetes. *Nature Metabolism*, 3(3), 394–409. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00369-9>
79. Stancáková, A., Civelek, M., Saleem, N. K., Soininen, P., Kangas, A. J., Cederberg, H., Paananen, J., Pihlajamäki, J., Bonnycastle, L. L., Morken, M. A., Boehnke, M., Pajukanta, P., Lusi, A. J., Collins, F. S., Kuusisto, J., Ala-Korpela, M., & Laakso, M. (2012). Hyperglycemia and a common variant of GCKR are associated with the levels of eight amino acids in 9,369 Finnish men. *Diabetes*, 61(7), 1895–1902. <https://doi.org/10.2337/db11-1378>
80. Würtz, P., Tiainen, M., Mäkinen, V. P., Kangas, A. J., Soininen, P., Saltevo, J., Keinänen-Kiukaanniemi, S., Mäntyselkä, P., Lehtimäki, T., Laakso, M., Jula, A., Kähönen, M., Vanhala, M., & Ala-Korpela, M. (2012). Circulating metabolite predictors of glycemia in middle-aged men and women. *Diabetes care*, 35(8), 1749–1756. <https://doi.org/10.2337/dc11-1838>

81. Boden, G., Chen, X., & Stein, T. P. (2001). Gluconeogenesis in moderately and severely hyperglycemic patients with type 2 diabetes mellitus. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 280(1), E23–E30. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.1.E23>
82. Del Coco, L., Vergara, D., De Matteis, S., Mensà, E., Sabbatinelli, J., Prattichizzo, F., Bonfigli, A. R., Storci, G., Bravaccini, S., Pirini, F., Ragusa, A., Casadei-Gardini, A., Bonafè, M., Maffia, M., Fanizzi, F. P., Olivieri, F., & Giudetti, A. M. (2019). NMR-Based Metabolomic Approach Tracks Potential Serum Biomarkers of Disease Progression in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Medicine*, 8(5), 720. <https://doi.org/10.3390/jcm8050720>
83. Saleem, T., Dahpy, M., Ezzat, G., Abdelrahman, G., Abdel-Aziz, E., & Farghaly, R. (2019). The Profile of Plasma Free Amino Acids in Type 2 Diabetes Mellitus with Insulin Resistance: Association with Microalbuminuria and Macroalbuminuria. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188(3), 854–867. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-02956-9>
84. Welsh, P., Rankin, N., Li, Q., Mark, P. B., Würtz, P., Ala-Korpela, M., Marre, M., Poulter, N., Hamet, P., Chalmers, J., Woodward, M., & Sattar, N. (2018). Circulating amino acids and the risk of macrovascular, microvascular and mortality outcomes in individuals with type 2 diabetes: results from the ADVANCE trial. *Diabetologia*, 61(7), 1581–1591. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4619-x>
85. Luo, H.-H., Li, J., Feng, X.-F., Sun, X.-Y., Li, J., Yang, X., & Fang, Z.-Z. (2020). Plasma phenylalanine and tyrosine and their interactions with diabetic nephropathy for risk of diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 8(1), e000877. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2019-000877>
86. O'Grady, K. L., Khosla, S., Farr, J. N., Bondar, O. P., Atkinson, E. J., Achenbach, S. J., Eckhardt, B. A., Thicke, B. S., Tweed, A. J., Volkman, T. L., Drake, M. T., Hines, J. M., & Singh, R. J. (2020). *Development and Application of Mass Spectroscopy Assays for Ne-(1-Carboxymethyl)-L-Lysine and Pentosidine in Renal Failure and Diabetes*. 11
87. Wang, W., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, J., & Wu, G. (2013). Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health. *Amino acids*, 45(3), 463–477. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1493-1>

88. Rowsell, E. V., al-Tai, A. H., & Carnie, J. A. (1973). Increased liver L-serine-pyruvate aminotransferase activity under gluconeogenic conditions. *The Biochemical journal*, *134*(1), 349–351. <https://doi.org/10.1042/bj1340349>
89. Wei, T., Zhao, L., Jia, J. *et al.* Metabonomic analysis of potential biomarkers and drug targets involved in diabetic nephropathy mice. *Sci Rep* **5**, 11998 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep11998>
90. Barrios, C., Zierer, J., Würtz, P., Haller, T., Metspalu, A., Gieger, C., Thorand, B., Meisinger, C., Waldenberger, M., Raitakari, O., Lehtimäki, T., Otero, S., Rodríguez, E., Pedro-Botet, J., Kähönen, M., Ala-Korpela, M., Kastenmüller, G., Spector, T. D., Pascual, J., & Menni, C. (2018). Circulating metabolic biomarkers of renal function in diabetic and non-diabetic populations. *Scientific Reports*, *8*(1), 15249. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33507-7>
91. Mahendran, Y., Cederberg, H., Vangipurapu, J., Kangas, A. J., Soininen, P., Kuusisto, J., Uusitupa, M., Ala-Korpela, M., & Laakso, M. (2013). Glycerol and fatty acids in serum predict the development of hyperglycemia and type 2 diabetes in Finnish men. *Diabetes care*, *36*(11), 3732–3738. <https://doi.org/10.2337/dc13-0800>
92. Van der Merwe, M. T., Schlaphoff, G. P., Crowther, N. J., Boyd, I. H., Gray, I. P., Joffe, B. I., & Lönnroth, P. N. (2001). Lactate and glycerol release from adipose tissue in lean, obese, and diabetic women from South Africa. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *86*(7), 3296–3303. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.7.7670>
93. Lebeck, J. (2014). Metabolic impact of the glycerol channels AQP7 and AQP9 in adipose tissue and liver. *Journal of Molecular Endocrinology*, *52*(2), R165–R178. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0268>

### Apêndice I - Protocolo

#### PROTOCOLO

# A metabolómica e os novos biomarcadores clínicos da diabetes tipo 2: revisão sistemática e meta-análise

Alda Jesus, Carina Silva e Luísa Veiga

#### INTRODUÇÃO

A Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença metabólica, crónica, que é caracterizada por níveis elevados de glicose no sangue.

Actualmente é considerado um problema de saúde global, cuja prevalência afeta aproximadamente 10 % da população mundial, segundo a Organização Mundial de Saúde.

A DM divide-se em dois tipos das quais o tipo 2 é o mais comum, sendo responsável por 90% de todos os casos<sup>1</sup>. Na Europa 1 em cada 10 habitantes de meia-idade desenvolve a doença (DT2) no decorrer de uma década. As previsões a dez anos apontam para que a prevalência da DT2 alcance os 366 milhões<sup>2</sup> atingindo proporções epidemiológicas<sup>3</sup>.

A DT2 é um fator de risco para desenvolver outras complicações tardias como as doenças cardiovasculares, nefropatias, neuropatias e retinopatias<sup>3</sup>.

O tratamento da DT2 e das suas comorbidades representa uma importante fração dos custos da saúde; sendo de grande interesse a prevenção, o tratamento e o acompanhamento adequado dos doentes por forma a controlar a progressão e o agravamento do estado de saúde, uma vez que se trata de uma patologia dinâmica que evolui ao longo dos anos de forma diferente em cada indivíduo<sup>3</sup>.

Hoje em dia, vêm-se como promotores de risco as escolhas individuais alimentares e do estilo de vida<sup>4</sup>.

O diagnóstico para a Diabetes é fundamentado na medição da concentração de glicose no sangue em jejum, teste oral de tolerância à glicose e no teste à hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>). Este último, informa sobre os níveis de glicose nos meses que precederam ao teste, informando um valor médio em vez de um valor num determinado momento<sup>3,5</sup>.

Contudo, estas avaliações apresentam algumas desvantagens, ou porque são inconvenientes para o doente, como é o caso do teste da medição da concentração da glicose em jejum; ou porque não estão indicados em alguns quadros clínicos como por exemplo o teste da HbA<sub>1c</sub> em doentes com insuficiência renal, em tratamento para o vírus da imunodeficiência humana (VIH) ou diabetes gestacional, porque podem levar a leituras incorrectas<sup>5</sup>.

Os testes são aplicados em doentes sintomáticos ou assintomáticos que tenham sido identificados como de risco. No entanto, aproximadamente 60% dos casos de DT2 não chegam a ser diagnosticados<sup>3,5</sup>.

A Metabolómica permite uma abordagem inovadora no diagnóstico da DT2 uma vez que identifica alterações a nível dos metabolitos que estejam relacionados com a doença.

A Diabetes tipo 2 desenvolve-se muito antes de ser passível de ser detectada pelos testes convencionais. Mas as alterações metabólicas precoces resultantes de modificações genéticas, por exemplo, podem ser assinaladas logo no início de vida<sup>6</sup>.

Desta forma a metabolómica é uma ferramenta valiosa para o diagnóstico precoce pela determinação de biomarcadores preditivos que aumentam a eficácia no diagnóstico e no tratamento reduzindo as comorbidades<sup>3</sup>.

## **PROPÓSITOS E OBJETIVOS**

Este estudo propõe-se a analisar e sistematizar os dados resultantes de estudos prévios, na área da metabolómica, que reportem os metabolitos relacionados com a DT2 com ou sem comorbidades comumente relacionadas com a patologia.

Tem como finalidade identificar os biomarcadores clínicos para a deteção da DT2 mas também para o estudo de complicações associadas à doença.

Os objetivos específicos são:

- 1- Sistematizar biomarcadores precoces da doença;
- 2- Sistematizar biomarcadores de risco para o desenvolvimento de complicações associados à DT2
- 3- Avaliar o nível de concordância entre os diferentes estudos.

## **MÉTODO**

### **Crítérios de elegibilidade do estudo**

Tipos de estudo. Serão incluídos todos os estudos de *cohorts*; *case-cohort*, *case-control* e *clinical-trials*. Não será imposto nenhuma restrição em relação ao tempo de *follow-up*, quando aplicável. Em contrapartida, serão excluídos revisões, comentários, editoriais ou cartas e publicações em duplicado.

**Participantes.** Os participantes incluídos para o estudo serão homens e mulheres com idades superiores a 18 anos. Os critérios de exclusão dos participantes serão grávidas, indivíduos com diabetes de outro tipo que não o tipo 2.

**Intervenção.** Serão incluídos apenas os estudos que recorram somente a técnicas metabólicas para a identificação dos metabolitos no contexto de DT2.

**Comparação.** A fim de alcançar o objetivo ao qual este trabalho se propõe, serão contemplada as comparações entre indivíduos com DT2 versus indivíduos que não sejam portadores da doença (controlo), doentes DT2 versus doentes DT2 + comorbidades (por exemplo: retinopatia, neuropatia, nefropatia, etc) e DT2 + comorbidades versus controlo.

**Outcome.** Serão admitidos como resultados: Diabetes tipo 2 e diabetes tipo dois combinada com qualquer uma das comorbidades relacionadas ou decorrentes da doença primária (diabetes).

### **Estratégia de pesquisa**

A pesquisa será efectuada em duas bases de dados eletrónicas: MEDLINE, via *PubMed* e EMBASE via *Ovid* no período decorrente entre 2010 e 2020.

Serão utilizadas palavras chave como metabólica, metabolitos e diabetes tipo 2. Serão aceites estudos em qualquer idioma.

Todos os estudos elegíveis serão filtrados manualmente.

### **Triagem da literatura**

Os títulos e os resumos dos estudos filtrados serão avaliados por dois revisores de forma independente de acordo com os critérios de inclusão / exclusão.

Posteriormente, será feito o levantamento integral do texto dos artigos de forma a avaliar a sua elegibilidade para o estudo. Esta análise será também efectuada por dois revisores independentes que em caso de divergências entre os dois, será avaliado por um terceiro revisor.

### **Extração dos dados**

Os dados serão extraídos para uma base de dados personalizada, de acordo com os dados que se mostrem relevantes para o presente estudo. Serão apenas incluídos os dados dos artigos que sejam completamente elegíveis.

## **Avaliação de qualidade**

Para averiguar a qualidade dos artigos e da avaliação do enviesamento dos dados será aplicada a matriz de avaliação *CASP checklist - Critical Appraisal Skills Programme* adaptada a cada tipo de estudo.

## **Síntese de dados**

Os dados serão apresentados de forma narrativa e com recurso a tabelas e /ou gráficos sempre que assim o justificar. A meta-análise será realizada com recurso ao *software* R em estudos clinicamente, metodologicamente e estatisticamente similares.

## **Registo**

Este estudo será registado no *International prospective register of systematic reviews* (PROSPERO).

## **DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

A diabetes tipo 2 é uma patologia metabólica e crónica que afeta actualmente um décimo da população mundial. A progressão da doença geralmente é silenciosa pelo que o seu diagnóstico é feito muitas vezes quando já existem outras complicações associadas ao quadro clínico da diabetes. As complicações geralmente associadas são doenças macro e microvasculares responsáveis pelo agravamento da condição de saúde. Actualmente o diagnóstico passa pela medição da glicose no sangue, no entanto muitos casos ficam por diagnosticar.

A possibilidade de efectuar um diagnóstico mais preciso e precoce da doença pode ser alcançado através da identificação de moléculas características e determinantes para a génese da DT2 e da sua progressão.

O recurso a técnicas moleculares como as ómicas, e em particular a metabolómica, possibilita traçar o perfil metabolómico da diabetes tipo 2. Este perfil é importante na medida em que indica potenciais biomarcadores. Um biomarcador é um indicador mensurável que indica sobre o estado particular de uma doença.

Este estudo pretende sistematizar os dados provenientes de estudos metabolómicos que determinem as principais moléculas associadas à DT2 com o objetivo de indicar possíveis biomarcadores para o diagnóstico precoce bem como para determinar o risco de desenvolver outras complicações.

## Reconhecimentos

Este protocolo foi elaborado como parte de uma dissertação do curso de Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde lecionado pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa.

## Contribuições

O tema do estudo foi ideia da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luisa Veiga, a elaboração será executada pela mestranda Alda Jesus e pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carina Silva. As revisões necessárias serão feitas pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luisa Veiga e pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carina Silva.

## Conflito de Interesses

Não existem conflitos de interesse a declarar.

## Financiamento

Não houve financiamento para a elaboração deste protocolo. Este protocolo é parte da dissertação de Alda Jesus para obtenção do grau de Mestre em Tecnologias moleculares em Saúde pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa.

## Referências

1. Neuenschwander, M., Ballon, A., Weber, K. S., Norat, T., Aune, D., Schwingshackl, L., & Schlesinger, S. (2019). Role of diet in type 2 diabetes incidence: Umbrella review of meta-analyses of prospective observational studies. *BMJ*, l2368.
2. Talmud, P. J., Hingorani, A. D., Cooper, J. A., Marmot, M. G., Brunner, E. J., Kumari, M., Kivimaki, M., & Humphries, S. E. (2010). Utility of genetic and non-genetic risk factors in prediction of type 2 diabetes: Whitehall II prospective cohort study. *BMJ*, 340(jan14 1), b4838–b4838.
3. Klein, M. S., & Shearer, J. (2016). Metabolomics and Type 2 Diabetes: Translating Basic Research into Clinical Application. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 1–10.
4. Carruth, L., & Mendenhall, E. (2018). Social aetiologies of type 2 diabetes. *BMJ*, k1795.
5. Kilpatrick, E. S., & Atkin, S. L. (2014). Using haemoglobin A1c to diagnose type 2 diabetes or to identify people at high risk of diabetes. *BMJ*, 348(apr25 3), g2867–g2867.
6. Bell, J. A., Bull, C. J., Gunter, M. J., Carlslake, D., Mahajan, A., Davey Smith, G., Timpson, N. J., & Vincent, E. E. (2020). Early Metabolic Features of

Genetic Liability to Type 2 Diabetes: Cohort Study With Repeated Metabolomics Across Early Life. *Diabetes Care*, 43(7), 1537–1545.

## Apêndice II - Artigos incluídos no estudo

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
Cáline Fernandez, et al. / 2019 / Diabetes Care	The Malmö Diet and Cancer – Cardiovascular Cohort (MDC-CC), Sweden	Prospective population-based Cohort	N=3,668 (506 T2D / 3,162 no diabetes) follow-up time 21.2 yrs.	Target Quantitative mass spectrometry–based lipid analysis / High-throughput shotgun lipidomics technology	Plasma	T2D	CE 14:0	9,67E-01	1.00 (0.88, 1.14)		
							CE 15:0	5,70E-03	0.84 (0.74, 0.95)		
							CE 16:0	6,66E-01	0.97 (0.86, 1.10)		
							CE 16:1	4,97E-02	1.13 (1.00, 1.29)		
							CE 17:0	8,66E-04	0.82 (0.72, 0.92)		
							CE 17:1	5,15E-01	0.96 (0.85, 1.09)		
							CE 18:0	8,00E-01	1.02 (0.90, 1.15)		
							CE 18:1	1,64E-01	0.92 (0.81, 1.04)		
							CE 18:2	2,44E-03	0.83 (0.73, 0.94)		
							CE 18:3	9,06E-01	1.01 (0.89, 1.14)		
							CE 20:2	1,96E-15	0.76 (0.71, 0.81)		
							CE 20:3	3,60E-03	1.21 (1.06, 1.37)		
							CE 20:4	1,37E-01	0.91 (0.81, 1.03)		
							CE 20:5	9,96E-01	1.00 (0.88, 1.13)		
							CE 22:6	3,35E-01	0.94 (0.83, 1.07)		
							Cer 40:1,2	8,89E-02	1.14 (0.98, 1.33)		
							Cer 40:2,2	4,06E-01	1.06 (0.93, 1.20)		
							Cer 42:1,2	2,34E-01	1.09 (0.94, 1.26)		
							Cer 42:2,2	8,44E-02	1.12 (0.98, 1.27)		
							Chol	2,76E-02	1.14 (1.01, 1.28)		
							DAG 16:0_0_18:1:0	4,02E-11	1.53 (1.35, 1.73)		
							DAG 16:0_0_18:2:0	6,53E-09	1.47 (1.29, 1.67)		
							DAG 16:1_0_18:1:0	2,13E-07	1.40 (1.23, 1.59)		
							DAG 18:1_0_18:1:0	9,00E-07	1.37 (1.21, 1.55)		
							DAG 18:1_0_18:2:0	1,79E-04	1.27 (1.12, 1.44)		
							DAG 18:1_0_18:3:0	2,76E-04	0.81 (0.73, 0.91)		
							LPC 14:0:0	6,08E-01	1.03 (0.91, 1.17)		
							LPC 16:0:0	2,35E-02	0.87 (0.77, 0.98)		
							LPC 16:1:0	1,64E-01	0.91 (0.81, 1.04)		
							LPC 18:0:0	4,98E-01	0.96 (0.85, 1.08)		
							LPC 18:1:0	2,72E-07	0.73 (0.65, 0.82)		
							LPC 18:2:0	5,33E-14	0.63 (0.55, 0.71)		
							LPC 20:3:0	9,59E-02	0.90 (0.79, 1.02)		
							LPC 20:4:0	3,75E-05	0.77 (0.68, 0.87)		
							LPC 22:6:0	4,71E-03	0.83 (0.74, 0.95)		
							LPE 16:0:0	4,74E-05	0.77 (0.68, 0.87)		

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
							LPE 18:0:0	2,92E-04	0.80 (0.71, 0.90)		
							LPE 18:1:0	8,51E-10	0.70 (0.63, 0.79)		
							LPE 18:2:0	8,48E-07	0.74 (0.65, 0.83)		
							LPE 20:4:0	2,28E-09	0.69 (0.61, 0.78)		
							PC 14:0_0_18:1:0	4,36E-02	0.87 (0.76, 1.00)		
							PC 14:0_0_18:2:0	8,09E-01	1.02 (0.89, 1.16)		
							PC 15:0_0_18:1:0	8,28E-02	0.90 (0.79, 1.01)		
							PC 15:0_0_18:2:0	8,57E-06	0.75 (0.66, 0.85)		
							PC 16:0_0_16:0:0	9,68E-01	1.00 (0.88, 1.13)		
							PC 16:0_0_16:1:0	2,36E-02	1.17 (1.02, 1.33)		
							PC 16:0_0_17:1:0	3,52E-01	0.94 (0.83, 1.07)		
							PC 16:0_0_18:0:0	9,80E-01	1.00 (0.88, 1.14)		
							PC 16:0_0_18:1:0	5,69E-01	1.04 (0.91, 1.18)		
							PC 16:0_0_18:2:0	1,19E-01	0.90 (0.80, 1.03)		
							PC 16:0_0_18:3:0	8,52E-01	0.99 (0.87, 1.13)		
							PC 16:0_0_20:1:0	8,21E-01	0.99 (0.87, 1.12)		
							PC 18:0_0_20:2:0	9,95E-02	1.13 (1.00, 1.28)		
							PC 16:0_0_20:3:0	6,42E-06	1.34 (1.18, 1.52)		
							PC 16:0_0_20:4:0	8,03E-01	1.02 (0.90, 1.15)		
							PC 16:0_0_20:5:0	9,10E-01	1.01 (0.89, 1.14)		
							PC 16:0_0_22:4:0	4,30E-01	0.95 (0.84, 1.08)		
							PC 16:0_0_22:5:0	1,42E-01	0.91 (0.80, 1.03)		
							PC 16:0_0_22:6:0	8,14E-01	1.02 (0.89, 1.15)		
							PC 16:1_0_18:0:0	1,20E-02	1.19 (1.04, 1.35)		
							PC 16:1_0_18:1:0	3,27E-02	0.86 (0.75, 0.99)		
							PC 16:1_0_18:2:0	2,58E-03	0.82 (0.72, 0.93)		
							PC 17:0_0_18:2:0	3,99E-03	0.83 (0.73, 0.94)		
							PC 17:0_0_20:3:0	4,58E-03	1.24 (1.07, 1.43)		
							PC 17:0_0_20:4:0	8,87E-02	0.89 (0.78, 1.02)		
							PC 18:0_0_18:1:0	9,27E-02	1.11 (0.98, 1.26)		
							PC 18:0_0_18:2:0	6,10E-01	1.03 (0.91, 1.17)		
							PC 18:0_0_18:3:0	1,05E-01	1.11 (0.96, 1.27)		
							PC 18:0_0_20:2:0	5,38E-01	1.04 (0.92, 1.18)		
							PC 18:0_0_20:3:0	1,40E-11	1.55 (1.36, 1.76)		
							PC 18:0_0_20:4:0	4,46E-02	1.13 (1.00, 1.28)		
							PC 18:0_0_20:5:0	2,12E-01	1.08 (0.96, 1.23)		
							PC 18:0_0_22:5:0	5,10E-02	1.13 (1.00, 1.28)		
							PC 18:0_0_22:6:0	5,89E-04	1.25 (1.10, 1.42)		
							PC 18:1_0_18:1:0	1,54E-03	0.81 (0.71, 0.92)		

(Continuação do apêndice II)

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
							PC 18:0_22:6:0	5,89E-04	1,25 (1,10, 1,42)		
							PC 18:1_0_18:1:0	1,54E-03	0,81 (0,71, 0,92)		
							PC 18:1_0_18:2:0	9,80E-04	0,80 (0,71, 0,92)		
							PC 18:1_0_20:2:0	7,27E-01	1,02 (0,90, 1,17)		
							PC 18:1_0_20:3:0	1,87E-01	1,09 ( 0,96, 1,24)		
							PC 18:1_0_20:4:0	1,17E-02	0,85 (0,74, 0,96)		
							PC 18:2_0_18:2:0	9,76E-10	0,69 (0,61, 0,78)		
							PC 18:2_0_20:3:0	4,60E-01	0,96 (0,85, 1,06)		
							PC 18:2_0_20:4:0	8,09E-03	0,85 (0,75, 0,96)		
							PC O-16:0/16:0:0	1,06E-08	0,75 (0,66, 0,83)		
							PC O-16:0/18:1:0	1,05E-01	0,91 (0,81, 1,02)		
							PC O-16:0/18:1:0	7,32E-08	0,73 (0,65, 0,82)		
							PC O-16:0/18:2:0	9,23E-12	0,63 (0,56, 0,72)		
							PC O-16:0/20:3:0	1,46E-01	0,91 (0,80, 1,03)		
							PC O-16:0/20:4:0	2,19E-01	0,93 (0,82, 1,05)		
							PC O-16:1/16:0:0	1,04E-06	0,73 ( 0,65, 0,83)		
							PC O-16:1/18:0:0	1,14E-11	0,70 (0,63, 0,77)		
							PC O-16:1/18:1:0	2,23E-09	0,68 (0,60, 0,77)		
							PC O-16:1/18:2:0	6,70E-10	0,68 (0,60, 0,77)		
							PC O-16:1/20:3:0	9,34E-01	1,01 (0,89, 1,13)		
							PC O-16:1/20:4:0	2,31E-02	0,87 (0,77, 0,98)		
							PC O-16:2/18:0:0	4,37E-05	0,79 (0,70, 0,88)		
							PC O-17:0/15:0:0	2,52E-03	0,83 (0,73, 0,93)		
							PC O-17:0/17:1:0	3,81E-01	0,94 (0,83, 1,07)		
							PC O-18:0/14:0:0	7,46E-04	0,82 (0,73, 0,92)		
							PC O-18:0/20:4:0	2,92E-06	0,74 (0,66, 0,84)		
							PC O-18:1/16:0:0	6,32E-05	0,77 (0,68, 0,88)		
							PC O-18:1/18:2:0	1,32E-06	0,73 (0,64, 0,83)		
							PC O-18:1/20:3:0	6,01E-01	1,04 (0,91, 1,18)		
							PC O-18:1/20:4:0	2,47E-03	0,82 (0,72, 0,93)		
							PC O-18:2/16:0:0	4,94E-15	0,60 (0,53, 0,69)		
							PC O-18:2/18:1:0	1,65E-12	0,64 (0,56, 0,72)		
							PC O-18:2/18:2:0	2,18E-05	0,76 (0,67, 0,86)		
							PC O-18:2/20:4:0	7,52E-02	0,89 (0,79, 1,01)		
							PE 16:0_20:4:0	5,60E-01	0,96 (0,85, 1,09)		
							PE 18:0_18:2:0	5,65E-02	1,13 (1,00, 1,28)		
							PE 18:0_20:4:0	5,75E-01	1,04 (0,91, 1,18)		
							PE 18:1_0_18:1:0	4,33E-01	0,95 (0,83, 1,06)		
							PE O-16:1/18:2:0	3,91E-01	0,94 (0,83, 1,06)		

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
							PE O-16:1/20:4:0	4,67E-01	0,95 (0,84, 1,08)		
							PE O-18:1/18:2:0	1,14E-04	0,81 (0,73, 0,90)		
							PE O-18:1/20:4:0	3,66E-03	0,83 (0,73, 0,94)		
							PE O-18:2/18:1:0	1,87E-03	0,82 (0,72, 0,93)		
							PE O-18:2/18:2:0	7,67E-05	0,78 (0,68, 0,88)		
							PE O-18:2/20:4:0	1,43E-02	0,86 (0,76, 0,97)		
							PI 16:0_18:1:0	5,22E-01	0,96 (0,85, 1,09)		
							PI 16:0_18:2:0	8,82E-02	1,12 (0,98, 1,27)		
							PI 16:0_20:4:0	3,80E-01	1,06 (0,93, 1,20)		
							PI 18:0_18:1:0	2,71E-01	0,93 (0,82, 1,06)		
							PI 18:0_18:2:0	8,62E-01	1,01 (0,89, 1,15)		
							PI 18:0_20:3:0	1,15E-01	1,11 (0,98, 1,26)		
							PI 18:0_20:4:0	1,40E-01	1,10 (0,97, 1,25)		
							PI 18:1_0_18:1:0	3,36E-03	0,83 (0,73, 0,94)		
							PI 18:1_0_18:2:0	3,75E-03	0,82 (0,72, 0,94)		
							PI 18:1_0_20:4:0	9,33E-03	0,84 (0,73, 0,96)		
							PI 18:2_0_18:2:0	4,60E-01	0,95 (0,84, 1,08)		
							SM 32:1:2	4,98E-01	1,05 (0,92, 1,20)		
							SM 34:0:2	1,19E-02	1,17 (1,04, 1,33)		
							SM 34:1:2	9,60E-01	1,00 (0,88, 1,14)		
							SM 34:2:2	6,70E-01	1,03 (0,90, 1,19)		
							SM 36:1:2	2,23E-05	1,33 (1,17, 1,52)		
							SM 36:2:2	2,86E-02	1,17 (1,02, 1,34)		
							SM 38:1:2	8,50E-03	1,19 (1,05, 1,36)		
							SM 38:2:2	8,04E-01	1,02 (0,89, 1,17)		
							SM 40:1:2	8,34E-05	1,29 (1,14, 1,46)		
							SM 40:2:2	3,33E-01	1,07 (0,93, 1,22)		
							SM 42:2:2	8,96E-03	1,18 (1,04, 1,34)		
							TAG 46:1:0	3,60E-06	1,35 (1,19, 1,53)		
							TAG 46:2:0	9,12E-06	1,32 (1,17, 1,49)		
							TAG 48:0:0	7,86E-15	1,63 (1,44, 1,85)		
							TAG 48:1:0	1,17E-11	1,52 (1,35, 1,72)		
							TAG 48:2:0	6,03E-08	1,40 (1,24, 1,59)		
							TAG 48:3:0	2,54E-05	1,31 (1,16, 1,49)		
							TAG 49:1:0	3,09E-08	1,44 (1,27, 1,64)		
							TAG 49:2:0	1,58E-06	1,36 (1,20, 1,54)		
							TAG 50:1:0	3,50E-16	1,65 (1,46, 1,86)		
							TAG 50:2:0	3,00E-11	1,51 (1,34, 1,71)		
							TAG 50:3:0	7,58E-08	1,41 (1,24, 1,59)		

(Continuação do apêndice II)

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
							TAG 50:4.0	1,33E-05	1,32 (1,17, 1,50)		
							TAG 50:5.0	3,10E-04	1,26 (1,11, 1,43)		
							TAG 51:1.0	6,83E-10	1,49 (1,31, 1,69)		
							TAG 51:2.0	5,21E-08	1,41 (1,24, 1,59)		
							TAG 51:3.0	3,78E-05	1,30 (1,15, 1,47)		
							TAG 51:4.0	5,07E-03	1,20 (1,06, 1,36)		
							TAG 52:2.0	6,66E-10	1,47 (1,30, 1,67)		
							TAG 52:3.0	2,33E-07	1,39 (1,23, 1,58)		
							TAG 52:4.0	1,74E-05	1,32 (1,16, 1,50)		
							TAG 52:5.0	1,61E-05	1,32 (1,16, 1,50)		
							TAG 52:6.0	2,60E-05	1,31 (1,16, 1,49)		
							TAG 53:2.0	3,35E-06	1,34 (1,19, 1,52)		
							TAG 53:3.0	6,33E-04	1,24 (1,10, 1,41)		
							TAG 53:4.0	3,91E-03	1,21 (1,06, 1,37)		
							TAG 54:3.0	4,65E-05	1,29 (1,14, 1,46)		
							TAG 54:4.0	4,19E-03	1,20 (1,06, 1,36)		
							TAG 54:5.0	1,45E-03	1,22 (1,06, 1,39)		
							TAG 54:6.0	7,21E-06	1,33 (1,17, 1,51)		
							TAG 54:7.0	3,43E-05	1,31 (1,15, 1,48)		
							TAG 56:3.0	9,73E-05	1,30 (1,14, 1,48)		
							TAG 56:4.0	3,94E-03	1,21 (1,06, 1,37)		
							TAG 56:5.0	4,20E-05	1,29 (1,14, 1,46)		
							TAG 56:6.0	9,47E-05	1,28 (1,13, 1,44)		
							TAG 56:7.0	4,13E-06	1,35 (1,19, 1,53)		
							TAG 58:8.0	1,66E-04	1,27 (1,12, 1,44)		
							TAG 58:8.0	5,94E-03	1,20 (1,05, 1,36)		

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
Haya Al-Sulaiti, et al. / 2019 / Journal of Translational Medicine	Al Emadi hospital and Hamad Medical Corporation, Qatar	Case-control	N=107; 75 obese (20 obese insulin sensitive + 40 obese insulin resistant + 14 T2D) and 32 lean	Untargeted. LC-MS (RP)/UPLC-MS/MS	Serum	Obese insulin resistant + T2D	Glucose	0.001			
							Palmitoleamide (16:1)*	0.001			
							3-(2-Hydroxyphenyl)Propionate	0.002			
							Cyclosporin A	0.002			
							3-Hydroxylaurate	0.002			
							Mannose	0.003			
							Heme	0.003			
							NENEN-Trimethyllysine	0.003			
							2'-Deoxyuridine	0.006			
							3-Hydroxyoctanoate	0.008			
							Glycoerythroacetate*	0.009			
							Dimethylarginine (Adma + Sdma)	0.009			
							Isoleucylglycine	0.009			
							3-Hydroxydecanoate	0.009			
							N-Acetylhistidine	0.010			
							Phosphate	0.011			
							Laurate (12:0)	0.012			
							3-Hydroxymyristate	0.012			
							26-Dihydroxybenzoic Acid	0.012			
							Tyramine O-Sulfate	0.013			
							Dodecanedioate (C12)	0.015			
							1-Methylhistidine	0.015			
							Lidocaine	0.015			
							Aconitate [Cis Or Trans]	0.015			
							Homoarginine	0.017			
							Stearoylcholine*	0.018			
							Kynurenine	0.019			
							Spermidine	0.019			
							15-Aryhydroxyisobutol (15-Ag)	0.019			
							Tryptophan	0.019			
							N-Acetylhistamine	0.020			
							Tizima Acetate	0.024			
							2-Methoxyacetaminophen Glucuronide*	0.024			
							Myristoyl-Linoleoyl-Glycerol (14:0/18:2) [1]*	0.025			
							Docosadiate (C22-Dc)	0.025			
							N-Stearoyl-Sphingadineine (D18:2/18:0)*	0.026			
							N-Stearoylserine*	0.026			
							Thromboxane B2	0.026			

(Continuação do apêndice II)

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels										
							Isoursodeoxycholate	0.027													
							Gamma-Tocopherol/Beta-Tocopherol	0.027													
							Diacylglycerol (12.0/18:1 14.0/16:1 16.0/14:1) [1]*	0.027													
							Sphinganine-1-Phosphate	0.027													
							Picolinate	0.028													
							Behenylcarnitine (C22)*	0.032													
							Linoleoylcarnitine*	0.032													
							Cys-Gly Oxidized	0.034													
							Glycochenodeoxycholate Glucuronide (1)	0.036													
							Adipate	0.037													
							7-Methylguanine	0.037													
							N6N6-Dimethyllysine	0.037													
							N-Stearoyl-Sphingosine (D18:1/18:0)*	0.038													
							1-Linoleoyl-2-Arachidonoyl-Gpe (18:2/20:4)*	0.039													
							Ethylmalonate	0.039													
							Butyrate (4:0)	0.039													
							Hydroxy-N6N6N6-Trimethyllysine*	0.040													
							N-Acetylglutamine	0.041													
							1-Palmitoyl-2-Alpha-Linolenoyl-Gpc (16:0/18:3N3)*	0.041													
							Dihydrocaffeate Sulfate (2)	0.042													
							Ornithine	0.042													
							Crotonine	0.045													
							2-Oxoarginine*	0.045													
							S-Adenosylhomocysteine (Sah)	0.045													
							Sulfate*	0.046													
							Quinolinate	0.047													
							3-Methoxycatechol Sulfate (1)	0.047													
							5-Acetylamino-6-Amino-3-Methyluracil	0.049													
							Jieli Lu, et al. / 2019 / Diabetes Care	Chinese adults; Shanghai, China				Cohort	N= 724 T2D / 724 no diabetes; follow-up time 4.4 yrs	Target HPLC- NRM	Serum	T2D	LP116:1	0.016	1.25 (1.20, 1.50)		
																	PC34:3	0.044	1.20 (1.00, 1.45)		
																	PE38:4p(18:0p/20:4)	0.030	0.86 (0.70, 0.98)		
							TAG50:2(16:2)	0.015	1.30 (1.05, 1.65)												
							TAG51:0(17:0)	0.041	1.25 (1.00, 1.55)												
							TAG54:7(22:6)	0.012	1.30 (1.05, 1.60)												

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
Zou-Zou Chen, et al. / 2019 / American Diabetes Association	Diabetes prevention program, (Americans)	Case-Control	N=2,015; follow up time 3.2 yrs	Target HILIC-MS; HPLC-MS; ASP/HILIC-MS	Plasma	T2D	Glucose/fructose/galactose	3.22x10 <sup>-01</sup>		1.45 (1.27-1.66)	
							Dimethylglycine	1.63x10 <sup>-01</sup>		1.06 (1.04-1.09)	
							C16:1 SM	2.71x10 <sup>-02</sup>		0.76 (0.66-0.87)	
							C5-DC Carnitine	6.30x10 <sup>-02</sup>		1.20 (1.09-1.32)	
							C50:4 TAG	1.08x10 <sup>-01</sup>		0.59 (0.46-0.77)	
							1,5- $\alpha$ -D-1-deoxyglucose	2.03x10 <sup>-01</sup>		0.80 (0.71-0.90)	
							C48:0 TAG	3.23x10 <sup>-01</sup>		1.22 (1.10-1.36)	
							C50:1 TAG	4.15x10 <sup>-01</sup>		1.36 (1.15-1.62)	
							Cytosine	2.55x10 <sup>-01</sup>		0.77 (0.66-0.89)	
							C22:1 SM	3.55x10 <sup>-02</sup>		0.80 (0.70-0.91)	
							C38:4 PC	1.40x10 <sup>-01</sup>		0.79 (0.68-0.91)	
							C18:0 CE	2.32x10 <sup>-02</sup>		0.82 (0.73-0.92)	
							C18:2 SM	4.93x10 <sup>-01</sup>		0.80 (0.69-0.91)	
							C16:0 SM	6.23x10 <sup>-02</sup>		0.82 (0.73-0.93)	
							C36:0 PC	1.17x10 <sup>-02</sup>		0.81 (0.71-0.92)	
							C64:0 TAG	2.27x10 <sup>-01</sup>		1.18 (1.06-1.31)	
							C36:4 PC Plasmalogen	4.46x10 <sup>-01</sup>		0.80 (0.69-0.92)	
							C52:5 TAG	7.67x10 <sup>-02</sup>		0.77 (0.66-0.91)	
							C20:0 SM	8.25x10 <sup>-02</sup>		0.83 (0.74-0.94)	
							Indole-3-carboxylic Acid	8.53x10 <sup>-01</sup>		1.14 (1.05-1.25)	
							C18:1 SM	4.90x10 <sup>-01</sup>		0.81 (0.70-0.93)	
							C14:0 SM	1.57x10 <sup>-02</sup>		0.83 (0.73-0.94)	
							C40:10 PC	3.84x10 <sup>-01</sup>		0.79 (0.67-0.93)	
							C42:0 TAG	3.21x10 <sup>-01</sup>		1.14 (1.04-1.25)	
							C46:0 TAG	2.65x10 <sup>-01</sup>		1.16 (1.05-1.29)	
							C5 Carnitine	5.38x10 <sup>-01</sup>		1.13 (1.04-1.23)	
							C52:3 TAG	4.60x10 <sup>-01</sup>		0.74 (0.60-0.91)	
							C50:0 TAG	8.92x10 <sup>-01</sup>		1.19 (1.06-1.34)	

(Continuação do apêndice II)

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels										
Filip Othman et al. / 2019 / JCEM	Two Swedish prospective cohorts: Malmö Preventive Project and Malmö Diet and Cancer-Cardiovascular Cohort (MDC-CC) Swedish adults Sweden	Case-cohort	N= 4121 (604 T2D / 3517 no diabetes) *MPP: N= 698 (496 healthy; 202 developed T2DM) Follow-up time 6.3 yrs. *Replicated: MDC-CC: N= 3423 (3027 healthy; 402 developed T2DM) Follow-up time 18.2 yrs	Untarget UPLC-QTOF-MS	Plasma	T2D	[*]DMGU	3.2e-7			1.63 (1.35-1.98)										
							[*]7MG	1.1e-4			1.49 (1.22-1.83)										
							[*]Kynurenate	1.1e-5			1.31 (1.16-1.48)										
							[*]HTML	5.1e-4			1.50 (1.19-1.87)										
							[*] Beta-carotene	2.3e-8			0.68 (0.60-0.78)										
							[*]N-Acetylcysteine	4.7e-4			1.27 (1.11-1.45)										
							[*]TMTL	2.0e-3			1.20 (1.07-1.34)										
							[*]Creatinine	0.28			1.07 (0.94-1.21)										
							[*]Hypoxanthine	1.5e-4			1.24 (1.11-1.38)										
							[*]Pantothanate	0.027			1.13 (1.01-1.27)										
							[*]Urea	2.7e-3			1.18 (1.06-1.31)										
							<b>Four metabolites are independent and replicable candidate biomarkers for incident T2DM</b>														
							DMGU	0.014			1.28 (1.05-1.55)										
							7MG	0.043			1.24 (1.01-1.52)										
							HTML	2.8e-3			1.42 (1.13-1.79)										
Urea	0.020	1.14 (1.02-1.27)																			
Samira Sathovic et al. / 2020 / Nature	PIVUS and ULSAM studies, Swedish adults, Sweden	Cohort	N= 1424 (197 T2D / 1227 no diabetes) Follow-up 12 yrs *PIVUS: N= 789 (109 T2D / 681 no diabetes). ULSAM: N= 635 (89 T2D / 546 no diabetes)	Untarget UPLC-MS	Urine	T2D	3-Methylxanthine	0.125	0.84 (0.68-1.05)												
							2-Heptenoyleglycine	0.681					1.06 (0.82-1.36)								
							Nonanoylcarnitine	3.11 x 10 <sup>-3</sup>					0.71 (0.56-0.89)								
							L-Tyrosine	0.789					1.04 (0.81-1.32)								
							NPC (rirotacan metabolite)	0.154					0.85 (0.68-1.06)								
							3-hydroxyundecanoyl-carnitine	1.56 x 10 <sup>-4</sup>					0.61 (0.47-0.79)								
							Vidaglietin	0.572					0.93 (0.73-1.19)								
Jordi Merino et al. / 2018 / Springer Nature	Framingham Heart Study Offspring cohort participants, Framingham, Massachusetts, EUA	Population-based prospective study	N=1150 (95 T2D /1055 no diabetes) Follow-up time 20 yrs	Target LC-MS/MS	Plasma	T2D	Glycine	2.84 x 10 <sup>-6</sup>			0.65 (0.54, 0.78)										
							Taurine	0.003					0.73 (0.59, 0.90)								
							Phenylalanine	0.002					1.35 (1.11, 1.65)								

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels	
Fengguo Xu et al. / 2013 / joem	Regional general hospital for health-screening - Khoo Teck Prat Hospital, Singapore;		N= 111 (24 impaired fasting glucose (IFG) / 27 T2D / 60 no diabetes)	Untarget GC-MS and LC-MS	Serum	T2D	[*] Myristic acid	0.002				
							[*] Palmitic acid	<0.001				
							[*] Stearic acid	<0.001				
							[*] Oleic acid	0.001				
							[*] Linoleic acid	0.001				
							[*] Arachidonic acid	0.001				
							[*] Phosphatidylcholine C34:1	0.003				
							[*] Phosphatidylcholine C34:2	<0.001				
							[*] Phosphatidylcholine C36:4	<0.001				
							[*] Phosphatidylcholine C38:6	<0.001				
							[*] Phosphatidylethanolamine (P-16:0e/0:0)	<0.001				
							[*] Sphingomyelin(d18:1/14:0)	0.018				
							[*] Sphingomyelin(d18:2/16:0)	<0.001				
							[*] Sphingomyelin(d18:1/16:0)	<0.001				
							[*] Alanine	<0.001				
							[*] Valine	<0.001				
							[*] Leucine	<0.001				
							[*] Isoleucine	<0.001				
							[*] Proline	<0.001				
							[*] Phenylalanine	0.025				
							[*] Glutamine	0.012				
							[*] Tyrosine	0.029				
							[*] Pyroglutamic acid	0.002				
							[*] Aminobutyric acid	<0.001				
							[*] Hydroxyisobutyric acid	<0.001				
							[*] Hydroxyisovaleric acid	0.002				
							[*] Camithine	0.001				
							[*] Acetylcarnitine	<0.001				
							[*] Mannose	<0.001				
							[*] D-Fructose	<0.001				
							[*] Glucose	<0.001				
							[*] Saccharides	<0.001				
							[*] Ethylene glycol	0.006				
[*] Hydroxybutyric acid	0.004											
[*] 3-Ketolactose	0.006											

(Continuação do apêndice II)

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels	
Xinfeng Liu et al. / 2016 / Nature	Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine for treatment of diabetes and coronary heart disease and healthy controls from the same hospital	Case-control	N= 71 (15 healthy controls, 13 coronary heart disease, 18 T2D and 25 T2DM-CHD patients)	Untarget H-NMR	Plasma	T2D - Coronary heart disease	(-) Isoleucine	0.008				
							(-) Valine	0.007				
							(-) Isopropanol	0.001				
							(-) Alanine	0.001				
							(-) Leucine	0.002				
							(-) Arginine	0.001				
							(-) Acetate	0.019				
							(-) Proline	0.001				
							(-) Glutamine	0.001				
							(-) Creatine	0.003				
							(-) Creatinine	0.001				
							(*) Glucose	0.001				
							(-) Glycine	0.001				
							(-) Threonine	0.001				
(-) Tyrosine	0.001											
(-) 3-methylhistidin	0.001											
YESEUNG LEE et al. / 2017 / INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE	Korean Cancer Prevention Study (KCAPS-II Biobank) Sejong City, Korea	Prospective cohort study, follow-up time 3 yrs	N= 99 (24 non-diabetic - negative control / 24 individuals who already had DM at the start of the study positive control / 25 patients who developed DM in the third year / 25 patients who developed DM in the second year)	Target LC-MS	Serum	T2D	Cholesterol	2.62x10 <sup>-4</sup>				
							25-Hydroxycholesterol	4.40x10 <sup>-5</sup>				
							3α,7α-Dihydroxy-5β-cholestane	1.77x10 <sup>-3</sup>				
							4α-Methylzymosterol-4-carboxylate	6.08x10 <sup>-4</sup>				
							24,25-Dihydrocholesterol	2.57x10 <sup>-3</sup>				
Gaokun Qiu et al. / 2016 / International Journal of Epidemiology	Dongfeng-Tongji (DF.TJ) cohort and Jiangsu Non-communicable Disease (JSNCD) cohort, Chinese adults	Prospective case-control	N= (1559 developed T2D in these two cohorts, and controls were 1:1 matched)	Target LC-MS	Plasma	T2D	Alanine	0.023	1.16 (1.02, 1.31)			
							Phenylalanine	0.29				1.08 (0.94, 1.24)
							Tyrosine	0.146				1.19 (0.94, 1.49)
							Palmitylcarnitine	0.089				1.11 (0.98, 1.25)
							Glutamate	0.043				1.14 (1.00, 1.29)
							Leucine/Isoleucine	0.003				1.26 (1.06, 1.46)
							Ornithine	0.001				1.24 (1.00, 1.40)
							Valine	0.050				1.14 (1.00, 1.29)
							Histamine	0.047				1.14 (1.00, 1.29)
							Inosine	0.004				1.2 (1.06, 1.36)

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels	
Prabhji Kaur / 2013 / Molecular BioSystems	Hamed Medical Hospital, Qatar University and Georgetown University, Qatar	Case-control	N=182 (105 T2D / 77 no diabetes) *Training set: N= 105 (64 T2D / 41 no diabetes). Validation: N= 77 (36 T2D / 36 no diabetes)	Target and Untarget UPLC-QTOF and UPLC-MRM mass spectrometry	Urine / Plasma	T2D						
Cassidy M. Ratholz et al. / 2016 / Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature	Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study, black and white participants, USA	Community-based cohort	N=2639 (1128 T2D / 1813 no diabetes), median follow-up time 20 yrs	Untargeted LC-MS	Serum	T2D	Isoleucine	3.18 × 10 <sup>-8</sup>	2.96 (2.02, 4.35)			
							Asparagine	4.19 × 10 <sup>-8</sup>				0.78 (0.71, 0.85)
							Leucine	6.78 × 10 <sup>-6</sup>				2.37 (1.63, 3.45)
							3-(4-Hydroxyphenyl)lactate	4.11 × 10 <sup>-5</sup>				1.55 (1.26, 1.92)
							Valine	6.95 × 10 <sup>-5</sup>				2.41 (1.56, 3.72)
							Trehalose	1.87 × 10 <sup>-5</sup>				1.16 (1.09, 1.25)
							Erythritol	1.63 × 10 <sup>-4</sup>				1.66 (1.28, 2.16)

(Continuação do apêndice II)

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
Lin Shi et al. / 2018 / Springer	Swedish prospective population-based Västerbotten Intervention Programme cohort, Sweden	Case-control	N= 503 (187 T2D / 316 no diabetes), follow-up time 10 yrs	Untargeted LC-MS	Plasma	T2D	lysPC(16:2)	0.021	0.75(0.6,0.94)		
							lysPC(16:1)	0.008	0.72(0.58,0.89)		
							lysPC(p16:0)	0.034	0.79(0.64,0.96)		
							lysPC(17:0)	0.013	0.74(0.6,0.92)		
							lysPC(19:1)	0.001	0.64(0.51,0.81)		
							lysPC(20:1)	0.021	0.77(0.63,0.94)		
							PC(16:0/16:1)	0.856	1.02(0.84,1.24)		
							PC 583.3792@10.75	<0.0001	0.56(0.44,0.72)		
							PC(14:0/16:1)	0.219	0.87(0.71,1.06)		
							PC(15:1/18:2)	0.158	0.84(0.68,1.04)		
							PC(17:0/18:2)	0.007	0.69(0.56,0.87)		
							DAG(16:1/16:1)	0.412	0.88(0.69,1.13)		
							DAG(14:0/16:0)	0.467	1.11(0.88,1.39)		
							DAG 531.4484@13.29	0.468	1.12(0.86,1.47)		
							DAG 571.4437@13.30	0.559	1.1(0.83,1.45)		
							DAG(14:0/18:1)	0.451	1.13(0.86,1.48)		
							DAG(16:0/18:1)	0.330	1.2(0.86,1.64)		
							Fatty acid 364.333@10.46	0.007	1.43(1.14,1.79)		
							Fatty acid 259.1608@7.63	0.003	1.82(1.3,2.53)		
							2-Methylbutyrylcarnitine	0.930	1.01(0.87,1.17)		
							3-Hydroxyisovalerylcarnitine	0.007	1.43(1.15,1.79)		
							Phenylalanine	0.172	1.18(0.96,1.45)		
							Leucine	0.001	1.63(1.26,2.11)		
							Isoleucine	0.001	1.7(1.31,2.21)		
							Valine	0.026	1.31(1.05,1.62)		
							Tryptophan	0.001	1.55(1.24,1.95)		
							L-Tyrosine	0.010	1.44(1.13,1.84)		
							Alanine	0.021	1.3(1.06,1.58)		
							Citulline	0.007	1.4(1.13,1.73)		
							N-Acetylglycine	0.055	0.81(0.66,0.99)		
							2-Hydroxyethanesulfonate	0.021	0.76(0.62,0.94)		
							Glutamate	0.930	0.99(0.8,1.23)		
							Glutamate derivate 316.0887@6.19	0.559	1.08(0.86,1.35)		
							Bile acid386.2455 @8.21	0.007	1.53(1.17,2.01)		
							3-methyl-2-oxovaleric acid	<0.0001	1.9(1.44,2.51)		
							161.0062@2.7	0.034	0.78(0.64,0.96)		
							88.0162@1.71	0.007	1.41(1.13,1.76)		
							198.0142@1.71	0.011	1.36(1.1,1.67)		

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
							491.1196@6.19	0.074	0.81(0.66,1)		
							518.4333@12.07	0.552	1.1(0.84,1.45)		
							590.4876@14.11	0.355	1.14(0.9,1.46)		
							428.2242@7.98	0.001	1.64(1.28,2.1)		
							566.3105@8.28	0.010	1.45(1.13,1.87)		
							614.3679@8.60	0.021	1.35(1.07,1.71)		
							665.2645@9.87	0.02	0.75(0.61,0.93)		
							597.4023@10.93	0.019	0.72(0.57,0.92)		

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
Yinghai Lu et al. / 2016 / Springer-Verlag Berlin Heidelberg	Singapore Chinese Health Study cohort Chinese population	Case-control	N= 394 (197 T2D / 197 no diabetes), follow-up time 6 yrs	Untargeted LC-MS and GC-MS	Serum	T2D	(†) Leucine	0.002	1.44 (1.07, 1.93)		
							(†) Isoleucine	0.002	1.44 (1.07, 1.93)		
							(†) Valine	<0.001	1.66 (1.21, 2.26)		
							(†) Palmitic acid (16:0)	<0.001	1.15 (1.15, 1.98)		
							(†) Stearic acid (18:0)	<0.001	2.10 (1.52, 2.91)		
							(†) Oleic acid (18:1)	<0.001	2.10 (1.52, 2.91)		
							(†) Linoleic acid (18:2)	<0.001	1.44 (1.01, 2.08)		
							(†) LPI (16:1)	<0.001	2.00 (1.42, 2.80)		
							(†) LPI (18:1)	0.001	1.43 (1.06, 1.93)		
							(†) LPI (18:2)	<0.001	1.61 (1.16, 2.20)		
							(†) LPI (20:3)	<0.001	1.51 (1.12, 2.04)		
							(†) LPI (20:4)	<0.001	1.59 (1.17, 2.18)		
							(†) LPI (22:6)	<0.001	1.46 (1.10, 1.94)		
							(‡) Proline	<0.001	0.44 (0.30, 0.66)		
							(‡) Glycerol	<0.001	0.48 (0.33, 0.70)		
							(‡) CMPF	0.001	0.76 (0.59, 0.99)		
							(‡)2-Aminooctanoic acid	0.003	0.69 (0.51, 0.93)		
							(†)Aminomalonic acid	<0.001	2.03 (1.46, 2.78)		
							(†)Glycine	<0.001	2.66 (1.72, 4.12)		
							(‡) Ornithine	0.001	0.63 (0.45, 0.88)		
							(‡) Phosphoserine	0.033	0.74 (0.57, 0.96)		
							(‡) Serine	0.013	0.68 (0.46, 0.94)		
							(†)Threonine	<0.001	1.53 (1.16, 2.02)		
							(†)Hippuric acid	0.036	1.32 (1.02, 1.71)		
							(†)CDP-glucose	0.012	1.41 (1.07, 1.87)		
							(†)D-Galactose	<0.001	2.12 (1.51, 2.98)		
							(†)Glucosate	0.006	1.38 (1.06, 1.80)		
							(‡) 9-Decenylcarnitine (C10)	<0.001	0.56 (0.39, 0.80)		
							(‡) LPE (20:3)	0.029	0.74 (0.55, 1.00)		
							(‡) LPE (20:5)	0.003	0.67 (0.50, 0.90)		
							(†)LPG (12:0)	<0.001	1.90 (1.27, 2.85)		
							(†)Lactic acid	0.002	1.42 (1.05, 1.91)		
							(†)Pyruvate	0.020	1.42 (1.01, 2.01)		
							(†)Urea	<0.001	1.97 (1.40, 2.77)		
							(†)1,3-Propanediol	<0.001	1.65 (1.24, 2.18)		

(Continuação do apêndice II)

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
Jun Ho Yun et al / 2019 PLOS ONE	Chungbuk National University Hospital, Korea	Case-control	N= 133 (51 T2D and high level of HbA1c / 82 T2D and normal level of HbA1c)	Target LC/MS/MS LC/MS/MS HPLC	Serum	T2D with normal levels HbA1c (± 6%)	(†) Threonine,	9.00E-08	3.77 (2.38-6.32)		
							(†) Lysine	4.00E-06	3.22 (2.02-5.46)		
							(†) Histidine	6.00E-06	2.97 (1.91-4.91)		
							(†) Methionine	5.00E-06	2.94 (1.90-4.81)		
							(†) Glutamine	1.00E-05	2.87 (1.84-4.71)		
							(†) Valine	5.00E-06	2.84 (1.86-4.57)		
							(†) Tryptophan	5.00E-06	2.83 (1.85-4.54)		
							(†) Sarcosine	2.00E-04	2.62 (1.64-4.47)		
							(†) Tyrosine	7.00E-05	2.32 (1.56-3.59)		
							(†) Serine	3.00E-04	2.13 (1.45-3.27)		
							(†) Glycine	4.00E-04	2.04 (1.39-3.09)		
							(†) LysPC a C18:1	2.00E-03	1.79 (1.24-2.65)		
							(‡) PC ac C36:1	2.00E-03	0.53 (0.35-0.79)		
							(‡) PC ac C26:0	1.00E-03	0.46 (0.28-0.72)		
							(‡) PC ac C34:2	3.00E-04	0.44 (0.28-0.68)		
							(‡) Hexose	5.00E-03	0.24 (0.08-0.55)		
							Liang Sun et al / 2016 / Diabetes Care	Nutrition and Health of Aging Population in China (NHAC) study Beijing and Shanghai	Population-based prospective study	N= 2,103 / 507 participants developed T2D. Follow-up time, 6 yrs	Target LC-MS/MS
(†) C16:2	<0.001	2.14 (1.90 - 2.41) RR									
(†) C18	<0.001	2.66 (2.35 - 3.01) RR									
(†) C18:0H	<0.001	1.36 (1.21-1.53) RR									
(†) C18:1	<0.001	1.76 (1.58-1.98) RR									
(†) C18:2	<0.001	2.46 (2.18-2.77) RR									
(†) C20	<0.001	2.17 (1.92-2.44) RR									
(†) C20:4	<0.001	2.41 (2.19-2.73) RR									
Gopal Peddinti et al. / 2017 / Springer	Botnia Prospective Study, Ostrobothnia, Finland	Case-control*	N= 543 non-diabetic (146 developed T2D / 397 no diabetes). Follow-up time 10 yrs.	Untarget and Target ultra-HPLC (UHPLC)-MS GC-MS UHPLC-MS/MS	Serum	T2D					
							Mannose,	$1.5 \times 10^{-11}$	2.05 (1.67, 2.54)		
							α-HB	$6.4 \times 10^{-6}$	1.57 (1.3, 1.92)		
							α-tocopherol	0.0011	0.62 (0.46, 0.81)		
							[Hypβ]-BK	$2.3 \times 10^{-6}$	0.55 (0.43, 0.7)		
							X-12063	$5.1 \times 10^{-10}$	1.86 (1.53, 2.27)		

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels							
Eie Ferrannini et al. / 2013 / Diabetes (American diabetes association)	Relationship between Insulin Sensitivity and Cardiovascular Disease (RISC) study - clinic and from lab- oratory personnel at 19 centers in 13 countries in Europe and Botnia Prospective Study - observational familial study on the West coast of Finland	Cohort follow-up 9.5 yrs. Europe	RISC N =1.308 ( 1.115 normal glucose tolerance / 146 impaired glucose regulation / 47 T2D). Botnia Prospective Study N = (1.811 normal glucose tolerance / 642 impaired glucose regulation )	Targeted UHPLC-MS/MS	Plasma	T2D + Dysglycemia	(†)Leucine (µmol/l)	0.004			145 [51]							
							(†)Isoleucine (µmol/l)	<0.003		72 [23]								
							(†)Valine (µmol/l)	0.003		217 [69]								
							(†)Alanine (µmol/l)	<0.001		371 [128]								
							(†)Arginine (µmol/l)	0.01		71 [23]								
							(‡)Asparagine (µmol/l)	ns		4.1 [3.2]								
							(†)Aspartate (µmol/l)	ns		45 [10]								
							(=)Citrulline (µmol/l)	ns		31 [12]								
							(‡)Glutamine (µmol/l)	0.001		11 [11]								
							(†)Glutamate (µmol/l)	<0.004		675 [368]								
							(‡)Glycine (µmol/l)	0.01		174 [60]								
							(‡)Histidine (µmol/l)	ns		41 [13]								
							(‡)Lysine (µmol/l)	ns		156 [35]								
							(=)Methionine (µmol/l)	ns		1.3 (1.6)								
							(‡)Ornithine (µmol/l)	ns		59 [23]								
							(=)Phenylalanine (µmol/l)	ns		55 [15]								
							(†)Proline (µmol/l)	ns		169 [56]								
							(‡)Serine (µmol/l)	ns		99 [14]								
							(†)Threonine (µmol/l)	ns		118 [32]								
							(‡)Tryptophan (µmol/l)	ns		54 [13]								
							(†)Tyrosine (µmol/l)	<0.01		61 [12]								
							Ali V. Ahois-Olli et al. / 2019 / Springer	Finnish observational cohorts, Finland.	Cohort; follow-up time 8-15 yrs	N= 11,896 (11,504 no diabetes / 392 T2D); 229 circulating metabolic measures	Target NMR	Serum	T2D	Isoleucine	1E-08	1.33 (1.21 - 1.47)		0.056
														Leucine	2E-08	1.33 (1.21 - 1.47)		0.084
Valine	0.001	1.20 (1.06 - 1.34)		0.20														
Phenylalanine	5E-07	1.31 (1.18 - 1.46)		0.081														
Tyrosine	0.002	1.18 (1.06 - 1.32)		0.054														
Glycerol	1E-04	1.22 (1.10 - 1.35)		0.11														
Glycoprotein acetyl (GlycA)	2E-09	1.37 (1.24 - 1.51)		1.34														
Total concentration of circulating fatty acids	1E-04	1.23 (1.11 - 1.36)		12.03														
Monounsaturated fatty acids	2E-06	1.32 (1.18 - 1.48)		25.60														
Nonesterified cholesterol in large HDL	4E-11	0.59 (0.50 - 0.68)		0.087														
Ratio of apolipoprotein B to apolipoprotein A1	2E-08	1.40 (1.25 - 1.58)		0.58														
larger VLDL particle size	1E-07	1.32 (1.19 - 1.47)		35.79														

(Continuação do apêndice II)

Author / year / Journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
Chao Zhu et al. / 2011 / Talanta	China-Japan Friendship Hospital (Beijing, China)	Case-control	N= 60 ( 30 control / 30 T2D)	Target NPLC-TOF/MS lon trap-MS/MS	Plasma	T2D	(†) Lyso-phosphatidylcholine C18:2 (†) Lyso-phosphatidylcholine C18:0 (†) Lyso-phosphatidylcholine C20:4 (†) Phosphatidylcholine C16:0/18:2 (‡) Phosphatidylcholine C16:0/18:0 (‡) Phosphatidylcholine C18:0/20:4 (†) Phosphatidylethanolamine C16:0/20:4 (†) Phosphatidylglycerol C18:0/18:2 (‡) Phosphatidylinositol C16:0/18:0 (‡) Phosphatidylinositol C18:0/20:4 (‡) Phosphatidylinositol C18:0/22:6 (†) Sphingomyelin dC18:0/22:2	<0.01 <0.01 <0.01 <0.01 <0.01 <0.01 <0.01 <0.01 <0.01 <0.01 <0.01			
Beatriz Garcia-Fontana et al. / 2015 / Alzanta	Caucasians, ambulatory and had neither renal, hepatic, gastrointestinal nor thyroid diseases. All T2DM patients were receiving medications for diabetes, including metformin, sulfonylureas, insulin or combination of these drugs. Endocrinology Unit of University Hospital San Cecilio in Granada.	cross-sectional study	N= 30 ( 10 T2D + CVD; 10 T2D; 10 no diabetes)	Target LC-HRMS	Serum	T2D	(‡) Phosphatidylcholine PC (16:1 (9Z)/2:0) (‡) Lyso-phosphatidylethanolamine LPE (18:2(9Z,12Z) 0:0) (‡) Lyso-phosphatidylcholine LPC (O-16:0:0) (‡) Phosphatidylcholine PC (O-12:0/2:0)	<0.01 <0.01 <0.01 <0.01			
Zhi Yang Tam et al. / 2017 / Nature	Acife Ulm study- population-based cohort study in older people Ulm, State Baden-Wuerttemberg, and adjacent regions in Southern Germany.	case-control	N=158 (80 T2D / 78 Control)	Untarget UPLC-MS LC-MS/MS	Urine	late-onset T2D	(‡) Phenylalanine (‡) Acetylhistidine (‡) Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) (†) 5'-methylthioadenosine (MTA)	< 0.005 < 0.001 < 0.001 < 0.001			
Jinying Zhao, et al. / 2015 / Diabetes Care	American Indians, residing in Arizona, North and South Dakota, and Oklahoma	Prospective investigation follow-up time 5.5 yrs	N= 431 (133 T2D / 298 no diabetes)	Untarget LC-MS	Plasma	T2D	2HBP X-1178			1.80 (1.26–2.57) 1.89 (1.29–2.77)	

Author / year / Journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
							VLDL-free cholesterol XXL-VLDL-cholesterol VLDL-triglycerides XXL-LDL-phospholipids XXL-LDL-triglycerides L-LDL-cholesterol XS-LDL-ApoB L-HDL-ApoA2 L-HDL-free cholesterol M-HDL-ApoA2	7.2x10 <sup>-7</sup> 4.9x10 <sup>-4</sup> 3.2x10 <sup>-6</sup> 4.4x10 <sup>-9</sup> 2.4x10 <sup>-4</sup> 8.1x10 <sup>-14</sup> 3.6x10 <sup>-6</sup> 2.1x10 <sup>-4</sup> 3.9x10 <sup>-12</sup> 5.8x10 <sup>-5</sup>	1.4 [1.2, 1.7] 1.3 [1.1, 1.5] 1.4 [1.2, 1.6] 0.6 [0.5, 0.7] 1.4 [1.2, 1.6] 0.5 [0.5, 0.6] 1.4 [1.2, 1.7] 1.4 [1.2, 1.6] 0.5 [0.4, 0.6] 1.4 [1.2, 1.7]		
Wenjuan Lin et al. / 2020 / Springer	Second Shaanxi Provincial People's Hospital and the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Chinese male	Case-control	N= 84 (42 T2D / 42 no diabetes)	Target GC-MS	Plasma	T2D	(†) Glucose (†) Mannose (†) Lactic acid (†) Tagatose (†) Fumaric acid (†) Alanine (†) Valine (†) Isoleucine (‡) Glycine (†) Serine (†) Threonine (†) Lysine (†) Tyrosine (†) Glutamic acid (†) Palmitic acid (†) Linoleic acid (†) Myristic acid (†) Oleic acid (†) Glycerol (‡) Glyceric acid (†) Glucuronic acid (†) Urea (‡) Urea (‡) Glycolic acid (†) ̢-Hydroxybutyric acid	0.041 0.016 0.031 0.045 0.042 0.00016 0.00066 0.0021 0.0000019 4.28E-08 9.48E-05 0.0063 1E-06 0.017 0.018 1.72E-05 0.038 2.58E-05 0.00059 0.029 0.04 0.0043 0.045 0.00035			

(Continuação do apêndice II)

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
Huijun Wang et al. / 2017 / Elsevier B.V.	Huaihe Hospital of Henan University Chinese adults	Prospective study	N= 90 (30 T2DM patients / 30 healthy controls.)	Untargeted GC/TOFMS	Serum	T2D	(†)Gentiic acid	0.00065			
							(†)Citraconic acid	0.00890			
							(L)Ribose	0.00000			
							(†)Glucosaminic acid	0.00000			
							(†)Succinic acid	0.00000			
							(†)2-Hydroxybutanoic acid	0.00711			
							(†)D-Erythro-sphingosine	0.00002			
							(†)Glycolic acid	0.02215			
							(L)D-Talose	0.00289			
							(L)beta-Mannosylglycerate	0.00000			
							(L)Allylmalonic acid	0.00003			
							(L)3-Hydroxy-L-proline	0.00043			
							(†)Conduitol b epoxide	0.00000			
							(†)2-Ketovaleic acid	0.00161			
							(†)Diocetyl phthalate	0.00108			
							(†)Levoglucosan	0.00008			
							(†)Glucose-1-phosphate	0.00009			
Marta Guasch-Farré / 2020 / The American Journal of Clinical Nutrition	Spain	Nested case-cohort study within the PREDIMED Study; follow-up time 3.8 yrs	N= 989 ( 251 incident T2D / 638 non-cases )	Targeted LC-tandem MS	Plasma	T2D (regardless diet)	Hexose monophosphate	0.001	1.43 (1.19, 1.72)		
							3-Phosphoglycerate	0.001	1.53 (1.22, 1.91)		
							Pyruvate	0.019	1.13 (0.91, 1.39)		
							Lactate	<0.001	1.60 (1.29, 1.99)		
							Citrate	<0.001	1.30 (1.09, 1.56)		
							Aconitate	<0.001	1.57 (1.29, 1.90)		
							Isocitrate	0.014	1.35 (1.13, 1.63)		
							Fumarate/maleate	<0.001	1.42 (1.19, 1.69)		
							Malate	0.001	1.25 (1.05, 1.49)		

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
Ai-hua Zhang et al. / 2013 / J Physiol Biochem; Springer	Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, China.	Clinical study	N= 123 (81 T2D / 42 control) "só apareceu nas tabelas sup.	Untarget UPLC-Q-TOF-HDMS *	Urine	T2D	(†)Adiponectin	0.00			
							(†)Acylcarnitines	0.00			
							(L)Citric acid	0.02			
							(L)Kynurenic acid	0.02			
							(†)3-indoxyl sulfate	0.02			
							(†)Bile acids	0.03			
							(L)Urate	0.04			
							(†)Glucose	0.01			
							(†)Glycine	0.01			
							(L)Glucuronolactone	0.02			
							(L)Lyxine	0.02			
							(L)Phosphate	0.03			
							Navdeep Gogna et al. / 2014 / Molecular BioSystems	diabetic, obese South Indian Asian	RCT	N= 310 ( 128 no diabetes / 17 pre-diabetes / 165 diabetes )	Untarget NMR
(†)Valine	0.035391			1.69 ± 0.32							
(†)3-Hydroxy-butyric acid	0.005139			2.59 ± 0.44							
(†)Isoleucine	0.0096155			1.98 ± 0.42							
(†)Lactate	0.013404			2.16 ± 0.61							
(†)Lyxine	0.0098384			1.25 ± 0.33							
(†)Glutamine	0.047726			1.48 ± 0.62							
(†)Choline	0.00001167			1.06 ± 0.41							
(†)Phenylalanine	0.029161			1.95 ± 0.27							
(†)Proline	0.00009955			1.16 ± 0.31							
(†)3,7-Dimethyluric acid	0.00008284			1.61 ± 0.56							
(†)Pantothenic acid	0.0001021			1.24 ± 0.43							
(†)Myoinositol	0.002050			1.58 ± 0.35							
(†)Threonine	0.005635			1.40 ± 0.21							
(†)Leucine	0.0006964			1.47 ± 0.41							
(†)Sorbitol	0.0043542			1.77 ± 0.66							
(†)Glycerol	0.000061967			2.22 ± 0.68							
(†)Glucose	0.00002468			5.38 ± 0.78							
(†)Histidine	0.0000839			1.80 ± 0.38							

(Continuação do apêndice II)

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
							PC aa C36:0 PC aa C36:6 PC aa C42:2 PC aa C42:5 PC aa C30:0 PC aa C34:1 PC aa C36:0 PC aa C38:0 PC aa C40:1 PC aa C42:1 PC aa C42:2 PC aa C44:3 AA (L) SM C16:1 (L) SM OH C14:1	2.54E-06 8.67E-06 7.42E-30 1.84E-05 3.63E-08 4.97E-06 2.27E-04 9.91E-16 5.24E-15 4.72E-48 1.98E-04 1.36E-56 1.40E-07 7.86E-06 1.15E-05			
Judd Bane et al. / 2012 / Nutrition & Metabolism		RTC	N= 78 ( 38 T2D / 40 control) 49 T1D, 38MetS excluí	Target MS	Serum	T2D	(T)Total acylcarnitine (T)C2-carnitine (T)C3-carnitine (T)C4-carnitine (T)C5-carnitine (L)C10:1-carnitine (L)C12-carnitine (L)C18:2-carnitine				8.565* (3.370) 6.057* (2.972) 0.415* (0.203) 0.123* (0.063) 0.136* (0.066) 0.197* (0.097) 0.067* (0.040) 0.057* (0.030)

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
Sirgt Knebel et al. / 2016 / The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism (JCEM)	§	Explorative study	N= 373 (244 T2D / 129 non diabetic) T1D =127 excluí da contagem da amostra pq não interessa.	Target MS	Plasma	T2D	(T)C3 (T)C4 (T)C18:2 (T)Pro (T)Phe (T)Tyr Ile Leu Val (T)Om (L) Spermidine (L) Taurine (L) C10:0 (capric) (L) C13:0 (tridecanoic) (L) cC14:1w5 (myristoleic) (T)C18:1w9 (oleic) (T)C18:4w3 (T)C20:4w6 (arachidonic) (T)C22:4w6 (adrenic) (L) H1  lysoPC a C28:1 PC aa C42:0 PC aa C42:1 PC aa C32:1 PC aa C32:2 PC aa C34:3 PC aa C36:2 PC aa C38:3 PC aa C42:3 PC aa C42:4 PC aa C42:5 PC aa C44:4 PC aa C28:1 PC aa C34:3	5.56E-06 8.28E-09 6.72E-09 2.90E-04 1.44E-07 7.07E-06 8.89E-17 3.45E-13 2.76E-08 9.71E-15 9.93E-09 4.27E-05 2.32E-04 3.07E-07 2.02E-04 2.46E-04 9.89E-05 2.52E-05 1.24E-05 1.44E-23  8.47E-28 3.07E-05 2.36E-11 9.29E-06 6.11E-10 3.68E-05 3.67E-07 5.06E-58 1.28E-27 2.59E-28 1.42E-21 7.29E-08 7.56E-06 1.34E-04			

(Continuação do apêndice II)

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
Clara Barrios et al. / 2018 / nature	Diabetic cohorts: GenodiabMar, TwinsUK and KORA. Non-diabetic cohorts: TwinsUK, KORA and YoungFins. European cohorts	Cohort	N= 5764 (926 T2D / 4838 non diabetic)	Target NMR	Serum	T2D with eGFR (Estimated glomerular filtration rate), T2D + Nephropathy	Glycine	<0.001	-8.37 [-9.73; -7.02]		
							Phenylalanine	<0.001	-7.92 [-9.27; -6.57]		
							Citrate	<0.001	-3.34 [-4.78; -1.90]		
							Glycerol	<0.001	-5.57 [-7.37; -3.77]		
							Apolipoprotein A-I	<0.001	3.62 [2.14; 5.10]		
							Total cholesterol in HDL2	<0.001	4.05 [2.59; 5.50]		
							Total cholesterol in very large HDL	<0.001	3.18 [1.74; 4.61]		
							Total cholesterol in HDL	<0.001	3.65 [2.19; 5.11]		
							Free cholesterol in medium HDL	<0.001	3.47 [2.03; 4.90]		
							Cholesterol esters in very large HDL	<0.001	3.14 [1.71; 4.57]		
							Concentration of very large HDL particles	<0.001	2.62 [1.17; 4.07]		
							Concentration of medium HDL particles	<0.001	3.33 [1.89; 4.76]		
							Total lipids in very large HDL	<0.001	2.97 [1.52; 4.42]		
							Total lipids in medium HDL	<0.001	3.33 [1.88; 4.77]		
							Phospholipids in medium HDL	<0.001	3.24 [1.80; 4.68]		
							Total cholesterol to total lipids ratio in chylomicrons and extremely large VLDL	<0.001	-3.02 [-4.55; -1.49]		
							Total cholesterol to total lipids ratio in IDL	<0.001	5.43 [4.08; 6.77]		
							Cholesterol esters to total lipids ratio in very small VLDL	<0.001	3.67 [2.28; 5.06]		
							Cholesterol esters to total lipids ratio in IDL	<0.001	5.45 [4.10; 6.79]		
							Triglycerides to total lipids ratio in very small VLDL	<0.001	-3.68 [-5.07; -2.30]		
							Triglycerides to total lipids ratio in large LDL	<0.001	-5.70 [-7.04; -4.36]		
							Triglycerides to total lipids ratio in medium LDL	<0.001	-5.43 [-6.79; -4.06]		
							Triglycerides to total lipids ratio in small LDL	<0.001	-5.00 [-6.37; -3.63]		
							Triglycerides to total lipids ratio in IDL	<0.001	-5.75 [-7.10; -4.40]		
							Triglycerides to total lipids ratio in large HDL	<0.001	4.17 [-5.60; -2.75]		
							Phospholipids to total lipids ratio in very small VLDL	<0.001	3.01 [1.61; 4.40]		

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels							
Dagmar Drogan et al. / 2015 / Clinical Chemistry	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)	Case-control	N= 600 ( 300 T2D / 300 control)	Untarget LC-MS	Serum	T2D	1-O-beta-D-glucopyranosyl-D-mannitol   Maltitol	0.009	0.41 (0.23 - 0.75)									
							Deoxyhexose sugar (e.g. anhydro-glucitol, deoxygalactose, deoxyglucose)	0.001	0.29 (0.15 - 0.56)									
							Tetrahydroxyhexanoic acid (e.g. 2-deoxyglucuronate, 3-deoxyarabinohehexonic acid)   hexosesugar (e.g. glucose, fructose,	0.001	3.05 (1.68 - 5.53)									
							Tetrahydroxyhexanoic acid (e.g. 2-deoxyglucuronate, 3-deoxyarabinohehexonic acid)   hexosesugar (e.g. glucose, fructose, inositol)	0.001	3.26 (1.78 - 5.97)									
							Tetrahydroxyhexanoic acid (e.g. 2-deoxyglucuronate, 3-deoxyarabinohehexonic acid)   hexosesugar (e.g. glucose, fructose, inositol)	<0.001	3.77 (2.01 - 6.66)									
							Tetrahydroxyhexanoic acid (e.g. 2-deoxyglucuronate, 3-deoxyarabinohehexonic acid)   hexosesugar (e.g. glucose, fructose, inositol)	<0.001	3.35 (1.75 - 6.42)									
							Tetrahydroxyhexanoic acid (e.g. 2-deoxyglucuronate, 3-deoxyarabinohehexonic acid)   hexosesugar (e.g. glucose, fructose, inositol)	<0.001	3.77 (1.99 - 7.12)									
							Hydroxy-methylbutenyl diphosphate	<0.001	3.86 (2.03 - 7.31)									
							Isopentenyladenosine-5'-monophosphate	<0.001	4.98 (2.45 - 10.11)									
							PC(22:4m/18:0)   PC(O-18:0/22:5)	0.001	4.93 (2.30 - 10.57)									
							PC(38:4)   PC(36:1)   PE(O-18:0/18:0)   PE(O-20:0/16:0)	0.006	2.62 (1.45 - 4.74)									
							PC(O-20:0/20:0)	0.004	0.28 (0.13 - 0.58)									
							GlcCer(d18:0/18:0)   PC(16:0/18:0)   PC(O-14:0/18:0)   PC(O-16:0/16:0)   PC(16:1/dm18:1)   PC(16:1dm18:1)   PC(18:2/dm18:0)   PC(O-16:0/18:3)   PC(O-16:0/18:3)   PC(P-16:0/18:2)	0.015	0.41 (0.22 - 0.76)									
							GlcCer(d18:0/22:0)   PC(O-14:0/22:0)   PC(O-16:0/20:0)   PC(O-18:0/18:0)   PC(O-20:0/16:0)   PC(20:1dm18:1)   PC(20:2/dm18:0)	0.001	0.28 (0.14 - 0.56)									
							LysoPC(dm16:0)	0.002	0.30 (0.16 - 0.59)									
							Diane M. Libert et al. / 2018 / PeerJ	Cleveland Clinic, Cleveland, OH, United States of America	RTC	N= 90 ( 20 T2D / 70 nondiabetic; - 24 LMW, 26 OBMW, 20 OBMUW).	Target LC-MS/MS	Plasma	T2D	(†) Aminoisoleucine	0.004			
														(†) Alpha-aminoacidipic acid	0.004			
(‡) Asparagine	0.0001																	
(†) 3-OHbutylcarnitine	0.0002																	
(†) Cystine	<0.0001																	
(†) Isoleucine	<0.0001																	
(†) Leucine	<0.0001																	
(†) Phenylalanine	<0.0001																	
(†) Valine	<0.0001																	

(Continuação do apêndice II)

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels							
Laura Del Coco et al. / 2019 / Clinical Medicine	Cohort of Italian T2DM patients and controls from Italian National Research Center on Aging (INRCA), Ancona.	Case-control	N= 33 ( 26 T2D; 13 T2D with complications / 13 T2D without complications) / 7 controls	Target H-NMR	Serum	T2D	Alanine	6.89 × 10 <sup>-7</sup>			1.14 ± 0.38 (1)							
							α-glucose	5.35 × 10 <sup>-7</sup>		3.16 ± 0.45 (†)								
							β-glucose	6.28 × 10 <sup>-9</sup>		2.33 ± 0.16 (†)								
							Carnitine	3.38 × 10 <sup>-4</sup>		2.04 ± 0.45 (1)								
							Citrate	1.2 × 10 <sup>-2</sup>		0.14 ± 0.04 (1)								
							Creatinine/creatinine	2.1 × 10 <sup>-9</sup>		0.6 ± 0.16 (1)								
							Glutamate	2.35 × 10 <sup>-5</sup>		0.41 ± 0.08 (1)								
							Glutamine	5.34 × 10 <sup>-5</sup>		0.26 ± 0.07 (1)								
							Isoleucine	1.15 × 10 <sup>-4</sup>		1.15 ± 0.24 (1)								
							Leucine	9.48 × 10 <sup>-6</sup>		1.64 ± 0.24 (1)								
							Lactate	1.18 × 10 <sup>-2</sup>		5.4 ± 1.6 (1)								
							Lysine	6.20 × 10 <sup>-7</sup>		0.29 ± 0.05 (1)								
							Methionine	1.17 × 10 <sup>-5</sup>		1.21 ± 0.33 (1)								
							N-acetyl/glycoproteins	0.2 × 10 <sup>-3</sup>		2.02 ± 0.55 (1)								
							Phenylalanine	2.54 × 10 <sup>-5</sup>		0.21 ± 0.04 (1)								
							Tyrosine	4.09 × 10 <sup>-5</sup>		0.14 ± 0.04 (1)								
Valine	7.35 × 10 <sup>-5</sup>		1.10 ± 0.19(1)															
Clara Barrios et al. / 2017/ Springer	Erasmus Ruchpen Family study, Southwest of the Netherlands	Cohort; follow-up time 14 yrs	N= 2776 ( 1205 T2D / 1571 nondiabetic)	Target NMR and LC-MS	Plasma	T2D	PC(O-34:2)	1.3×10 <sup>-7</sup>	0.6 [0.5, 0.7]									
							Isoleucine	2.7×10 <sup>-20</sup>	2.4 [2.0, 2.9]									
							Methionine	1.2×10 <sup>-4</sup>	1.4 [1.2, 1.6]									
							Tyrosine	1.6×10 <sup>-5</sup>	1.5 [1.2, 1.7]									
							2-hydroxybutyrate	2.5×10 <sup>-13</sup>	2.0 [1.7, 2.5]									
							1,5-AG	5.0×10 <sup>-19</sup>	2.3 [1.9, 2.7]									
							2-oxoglutaric acid	2.70×10 <sup>-6</sup>	1.5 [1.3, 1.8]									
							Glycine betaine	2.50 × 10 <sup>-17</sup>	2.2 [1.8, 2.6]									
							Glycerol	2.1×10 <sup>-14</sup>	2.3 [1.8, 2.8]									
							Lactate	4.9×10 <sup>-11</sup>	1.7 [1.4, 1.9]									
							Pyruvate	3.0×10 <sup>-9</sup>	1.6 [1.4, 1.8]									
							TG (48:0)	2.3×10 <sup>-5</sup>	1.4 [1.2, 1.6]									
							TG (48:1)	1.3×10 <sup>-4</sup>	1.4 [1.2, 1.6]									
							TG (50:5)	2.3×10 <sup>-3</sup>	1.3 [1.1, 1.4]									
							VLDL-free cholesterol	7.2×10 <sup>-7</sup>	1.4 [1.2, 1.7]									
							XXL-VLDL-cholesterol	4.9×10 <sup>-4</sup>	1.3 [1.1, 1.5]									
							Jun Ho Yun et al. / 2020 / PLOS ONE	Chungbuk National University Hospital, South Korea	Case-control	N= 517 DT2 (143 NDR / 123 NPDR / 51 PDR). NDR - non diabetic retinopathy / NPDR - non proliferative DR / PDR - proliferative DR	Target LC-MS	Serum	T2D-DR (metabólitos associados com retinopatia diabética)	Tetradecenoylcarnitine (C14:1)	4,32E-03	0.63 (0.46 - 0.82)		
														Hexadecenoylcarnitine (C16)	6,68E-04	0.59 (0.45 - 0.75)		
														Lysine	2,90E-03	0.63 (0.49 - 0.81)		
Methionine	1,69E-04	0.53 (0.4 - 0.69)																
Tryptophan	4,48E-08	0.36 (0.26 - 0.49)																
Tyrosine	1,42E-06	0.43 (0.31 - 0.57)																
Total Dimethylarginine (Total DMA)	4,28E-04	2.3 (1.59 - 3.47)																
Phosphatidylcholine diacyl C32:2 (PC aa C32:2)	1,82E-05	0.47 (0.34 - 0.62)																
Phosphatidylcholine diacyl C34:2 (PC aa C34:2)	6,68E-04	0.58 (0.42 - 0.73)																
Phosphatidylcholine diacyl C36:2 (PC aa C36:2)	4,28E-04	0.58 (0.43 - 0.73)																
Phosphatidylcholine diacyl C38:6 (PC aa C32:6)	1,49E-03	0.61 (0.47 - 0.78)																
Phosphatidylcholine diacyl C40:6 (PC aa C40:6)	1,15E-03	0.6 (0.46 - 0.77)																
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C36:5 (PC ae C36:5)	1,03E-02	0.67 (0.51 - 0.86)																
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C42:3 (PC ae C42:3)	1,60E-02	0.69 (0.53, 0.88)																
Hydroxyphosphorylamine C22:1 (SM (OH) C22:1)	1,22E-03	0.6 (0.46 - 0.77)																
Sphingomyeline C24:0 (SM C24:0)	4,28E-03	0.57 (0.44 - 0.74)																
Liyun Chen et al. / 2018 / Diabetes - American Diabetes Association	Singapore Indian Eye Study (SINDI)	Case-control	N= 120( 40 DR / 40 T2D non DR / 40 healthy). DR - diabetic retinopathy	Target GC-MS	Plasma	T2D-DR (diabetic retinopathy)								1,5-Anhydroglucitol		0.37 (0.19-0.65)*		
														1,5-Gluconolactone	<0.05	2.40 (1.38-4.65)		
														2-Deoxyribonic acid	<0.05	2.08 (1.25-3.76)		
														3,4-Dihydroxybutyric acid	0.05 ↔P(model)=0,1	1.61 (1.03-2.70)		
							Erythritol	<0.05	1.68 (1.04-2.85)									
							Gluconic acid	<0.05	2.65 (1.50-5.33)									
							Lactose/Cellobiose	<0.05	1.78 (1.10-3.01)									
							Maltose/Trehalose	<0.05	2.14 (1.29-3.64)									
							Mannose	<0.05	1.81 (1.09-3.27)									
							Ribose	<0.05	1.65 (1.02-2.80)									
							Urea	<0.05	1.95 (1.18-3.48)									
Hang Zhang et al. / 2020 / Hindawi	Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, China	Case-control	N= 44 T2D (20 T2D non-DKD / 24 DKD). DKD - diabetic kidney disease	Target LC-MS	Urine	T2D -DKD	Hexadecanoic Acid (C16:0)	0.002	0.2 (0.1, 0.5)									
							Linoleic Acid (C18:2n6t)	<0.001	0.2 (0.1, 0.5)									
							Linoleic Acid (C18:2n6c)	0.001	0.2 (0.1, 0.6)									
							Trans-4-Hydroxy-L-Proline	0.006	2.4 (1.3, 4.5)									
							6-Aminocaproic Acid	0.001	4.3 (1.8, 10.5)									
							L-Dihydroxocrotic Acid	0.001	35.0 (4.0, 308.4)									
							6-Methylmercaptopurine	0.009	2.7 (1.3, 5.8)									
							Piperidine	0.002	49.3 (4.1, 589.9)									
							Azoxystrobin Acid	0.002	0.0 (0.0, 0.0)									
							Lysopc 20:4	0.004	0.4 (0.2, 0.7)									
							Cuminaldehyde	0.006	14.9 (2.2, 101.8)									

(Continuação do apêndice II)

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
Smita Devi et al. / 2019 / Nature	Chennai, India, South Asian Indian male	Case-control	N= 31 T2D-DN / 29 T2D / 30 normal glucose tolerance (NGT)	Untarget. Iq-resolution accurate-mass (HRAM) / UHPLC	Plasma	T2D-DN (diabetic nephropathy)	(betaS)-beta-Hydroxy-L- tryptophan	0.011			
							(R)-3-hydroxybutyrylcamitine	0.008			
							2-Amino-9,10-epoxy-8- oxodecanoic acid	0.046			
							6-Oxo-2-piperidinecarboxylic acid	<0.001			
							Anagestone Acetate	0.005			
							Apronolide	<0.001			
							Cholecalciferol	0.043			
							Diosgenin	0.022			
							DL- Dipalmitoylphosphatidylcholine	0.002			
							Imidazolelactate	<0.001			
							Lauramide	0.031			
							N-Acetylornithine	<0.001			
							Primobolan	0.010			
							Tetrahydrocorticosterone	<0.001			
							Trigonelline	0.002			
							Xanthophin	<0.001			
							Kazuo Omori et al. / 2020 / Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	candidates for atherosclerosis in Japanese patients with T2DM	Case-control	N=176 patients with T2DM who have never had a CVD / 40 who were survivors of coronary artery disease (CAD)	Untarget. GC-MS
3-Aminoisobutyric acid											
Galactose + Glucose											
Glucronic acid											
Glucose											
Glucuronic acid											
Inoxyf sulfate											
Inositol											
Mannose											
Meso-erythritol											
O-Phosphoethanolamine											
Pyroglutamic acid											
Urea											

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
Huan-Tang Lin et al. / 2019 / Journal of Clinical Medicine	Linkou Cheng Gung Memorial Hospital, Taiwan	prospective cohort study	N= 60 (40 T2D / 40 control)	Untarget. NMR	Plasma	T2D	Plasma glucose	0.003 *	1.092		
							Plasma HbA1c	0.019 *	1.286		
							Plasma HOMA-IR	0.027 *	1.712		
							Alanine	0.004 *	0.998		
							Histidine	0.003 *	0.974		
							Leucine	0.036 *	1.004		
							Pyruvate	0.051	1.003		
							Tyrosine	0.048 *	1.010		
							Valine	0.911	1.000		
							Six-metabolite combination <sup>a</sup>	<0.001 *	3.352		
						T2D + Retinopathy	Plasma glucose	0.548	1.003		
							Plasma HbA1c	0.855	0.989		
							Plasma HOMA-IR	0.600	1.063		
							Alanine	0.929	1.000		
							Histidine	0.832	0.998		
							Leucine	0.550	0.998		
							Pyruvate	0.083	0.914		
							Tyrosine	0.628	1.003		
							Valine	0.079	0.998		
							Six-metabolite combination <sup>a</sup>	<0.001*	2.954		
						T2D + Nephropathy	Plasma glucose	0.172	0.992		
							Plasma HbA1c	0.189	1.097		
							Plasma HOMA-IR	0.292	0.878		
							Alanine	0.829	1.000		
							Histidine	0.329	1.008		
							Leucine	0.080	0.995		
							Pyruvate	0.385	0.998		
							Tyrosine	0.014 *	0.984		
							Valine	0.169	0.999		
							Six-metabolite combination <sup>a</sup>	<0.001 *	3.650		

(Continuação do apêndice II)

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
						T2D + Neuropathy	Plasma glucose	0.273	0.988		
							Plasma HbA1c	0.687	1.028		
							Plasma HOMA-IR	0.650	0.880		
							Alanine	0.513	0.999		
							Histidine	0.712	1.004		
							Leucine	0.147	0.994		
							Pyruvate	0.349	0.997		
							Tyrosine	0.677	1.004		
							Valine	0.214	0.998		
							Six-metabolite combination <sup>a</sup>	0.087	3.237		
Danxia Yu et al. / 2015 / Springer	Shanghai Women's Health Study (SWHS) and the Shanghai Men's Health Study (SMHS), Shanghai, China	Case-control	N= ( 835 No T2D / 68 T2D / 73 developed T2D )	Untarget. LC-MS	Plasma	T2D	1,5-Anhydroglucitol		0.42 (0.34, 0.51) *		
							Mannose		3.03 (2.34, 3.91) *		
							Glucose		2.43 (1.93, 3.05) *		
							Fructose		1.77 (1.41, 2.23) *		
							Gluconate		2.65 (1.96, 3.58) *		
							3-Hydroxypyruvate		2.39 (1.66, 3.44) *		
							2-Hydroxybutyrate		2.02 (1.55, 2.63) *		
							2-Aminobutyrate		1.77 (1.34, 2.33) *		
							2-Ketobutyrate		1.43 (1.06, 1.92)	1.81 (1.35, 2.42) *	
							3-Hydroxyisobutyrate		1.64 (1.25, 2.14) *		
							3-Hydroxypropanoate		1.61 (1.24, 2.08) *		
							Pyroglutamine		0.52 (0.38, 0.69) *		
							Glycine		0.67 (0.52, 0.87)	0.58 (0.46, 0.75) *	
							3-Methoxytyrosine		0.72 (0.55, 0.94)	0.61 (0.46, 0.79) *	
							O-Sulfo-L-tyrosine		0.64 (0.49, 0.84) *		
							o-Glutamylglutamine		0.71 (0.54, 0.94)	0.63 (0.48, 0.83) *	
							Pseudouridine		0.57 (0.43, 0.75) *		
							Kynurenine		0.57 (0.43, 0.76) *		
							Dimethylarginine		0.65 (0.51, 0.83) *		
							Citrulline		0.66 (0.50, 0.85) *		
							Imidazole propionate		1.49 (1.17, 1.89) *		
							2-Arachidonylglycerol		0.53 (0.42, 0.69) *		
							1-Palmitoyl-glycerophosphoinositol		0.60 (0.45, 0.79) *		
							1-Oleoyl-glycerophosphoinositol		0.60 (0.44, 0.81) *		

Author / year / journal	Study population	Study design	N, follow-up	Technique and metabolite targets	Biological sample	Outcome	Metabolite	P-value	OR (95% CI) /RR per SD	HR (95% CI)	Relative Concentrations mean ± SD / Levels
							Androstereone sulfate		0.67 (0.53, 0.85) *		
							Epiandrostereone sulfate		0.67 (0.53, 0.85) *		
							Pelargonate (9:0)		0.65 (0.50, 0.84) *		
							N <sup>6</sup> -Carbamoyl-threonyl-adenosine		0.61 (0.46, 0.81) *		
							Pyruvate		1.26 (0.96, 1.65)	1.64 (1.27, 2.11) *	
							Valine		1.19 (0.90, 1.58)	1.80 (1.37, 2.38) *	
							3-Methyl-2-oxobutyrate		1.10 (0.84, 1.44)	1.97 (1.51, 2.57) *	
							3-Methyl-2-oxovalerate		1.26 (0.96, 1.65)	1.89 (1.44, 2.49) *	
							4-Methyl-2-oxopentanoate		1.25 (0.96, 1.62)	1.81 (1.39, 2.36) *	
							Cyclo(leu-pro)		1.11 (0.84, 1.45)	1.72 (1.34, 2.22) *	
							Docosapentenoate (22:5n3)		0.96 (0.73, 1.26)	1.62 (1.25, 2.10) *	
							Bradykinin-Hydroxy-pro(3)		0.93 (0.66, 1.26)	0.54 (0.38, 0.77) *	
Filip Ojsson et al. / 2020 / MDPI Metabolites	The Malmö Diet and Cancer-Cardiovascular Cohort (MDC-CC) and The Malmö Preventive Project (MPP), Swedish population-based	Prospective Cohort	N= 918 ( 743 T2D / 175 T2D + CVD / 298 deaths )	Target LC-MS	Plasma	*All-Cause Mortality in Individuals with Type 2 Diabetes*	N2,N2-dimethylguanosine	1.9 × 10 <sup>-5</sup>		1.45 (1.22-1.72)	
							DMGV	2.0 × 10 <sup>-4</sup>		1.31 (1.14-1.51)	
							Lysine	2.0 × 10 <sup>-4</sup>		0.80 (0.71-0.90)	
							Homocitrulline	7.6 × 10 <sup>-4</sup>		1.34 (1.13-1.58)	
							Hippurate	3.4 × 10 <sup>-3</sup>		0.78 (0.66-0.92)	
							1-methyladenosine	9.4 × 10 <sup>-3</sup>		1.18 (1.04-1.35)	
							Acylcarnitine C10:3	0.012		1.19 (1.04-1.36)	
							Tryptophan	0.013		0.85 (0.75-0.97)	
							Urobilin	0.023		1.15 (1.02-1.30)	
							Threonine	0.039		0.86 (0.75-0.99)	
							Acisoga	0.11		1.11 (0.98-1.25)	
Bernd Stralmann et al. / 2016 / International Journal of Endocrinology	Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen (HDZ NRW) in Bad Oeynhausen, Germany	Cohort	N= ( 57 T2D / 26 T2D + CAD)	Target MS-MS	Serum	T2D+CAD	C0	0.026	6.97 [1.70; 61.93]		
							Serine	0.045	0.15 [0.01; 0.70]		
							PC aa C36:1	0.020	0.16 [0.02; 0.60]		
							PC aa C38:3	0.045	0.21 [0.04; 0.81]		

## Apêndice III - Dados para meta-análise

Table. 4 - Description of data included in meta-analysis

Metabolite	Author / year / journal	Participants (N)	T2D	No T2D	p-value	OR (95% IC) per SD	HR (95% CI) per SD	Média	OUTCOME
<b>Valine</b>									
	1 Casey M. Rebholz et al. / 2018 / Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature	2939	1126	1813	6.95 x 10 <sup>-5</sup>		2.41 (1.56, 3.72)		T2D
	2 Lin Shi et al. / 2018 / Springer	503	187	316	0.026	1.31 (1.05, 1.62)			T2D
	3 Yonghai Lu et al. / 2016 / Springer-Verlag Berlin Heidelberg	394	197	197	<0.001	1.66 (1.21, 2.26)			T2D
	4 Jun Ho Yun et al. / 2019 /PLOS ONE	133	133	0	5.00 x 10-06	2.84 (1.86, 4.57)			T2D with normal levels HbA1c (≤ 6%)
	5 Gaokun Qiu et al. / 2016 / International Journal of Epidemiology	3118	1559	1559	0.050	1.14 (1.00, 1.28)			T2D
	6 Ari V. Ahola-Olli et al. / 2019 / Springer	11896	392	11504	0.001	1.20 (1.08, 1.34)			T2D
	7 Huan-Tang Lin et al. / 2019 / Journal of Clinical Medicine	80	40	40	0.911	1.000			T2D
0.079					0.998			T2D + Retinopathy	
0.169					0.999			T2D + Nephropathy	
0.214					0.998			T2D + Neuropathy	
	8 Danxia Yu et al. / 2015 / Springer	976	141	835	?	1.19 (0.90, 1.58)	1.80 (1.37, 2.38)*		Associated with incident T2D
<b>TOTAIS</b>		<b>18963</b>	<b>3594</b>	<b>15369</b>					
	9 Fengguo Xu et al. / 2013 / Joem	87	27	60	<0.001			4.04 (1.28)	T2D
	10 Xinfeng Liu et al. / 2016 / Nature	125	97	28	0.007			10.42 ± 2.02*	T2D + Coronary heart disease
	11 Navdeep Gogna et al. / 2014 / Molecular BioSystems	293	165	128	0.035391			1.69 ± 0.32	T2D low BMI
	12 Ele Ferrannini et al. / 2013 / Diabetes (American diabetes association)	1308	47	1261	0.003			217 [69]	T2D + Dysglycemia
	13 Diane M. Libert et al. / 2018 / PeerJ	90	20	70	<0.0001			-	T2D
	14 Wenjuan Lin et al. / 2020 /Springer	84	42	42	0.00066			-	T2D
	15 Laura Del Coco et al. / 2019 / Clinical Medicine	33	26	7	7.35 x 10 <sup>-5</sup>			1.10 ± 0.19	T2D
<b>TOTAIS</b>		<b>1903</b>	<b>356</b>	<b>1547</b>					

(Continuação do apêndice III)

Table. 4 - Description of data included in meta-analysis

Metabolite	Author / year / journal	Participants (N)	T2D	No T2D	p-value	OR (95% IC) per SD	HR (95% CI) per SD	Média	OUTCOME
<b>Isoleucine</b>									
1	Ari V. Ahola-Olli et al. / 2019 / Springer	11896	392	11504	1 x 10 <sup>-08</sup>	1.33 (1.21, 1.47)			T2D
2	Casey M. Rebholz et al. / 2018 / Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature	2939	1126	1813	3.18 x 10 <sup>-8</sup>		2.96 (2.02, 4.35)		T2D
3	Lin Shi et al. / 2018 / Springer	503	187	316	0.001	1.7 (1.31,2.21)			T2D
4	Yonghai Lu et al. / 2016 / Springer-Verlag Berlin Heidelberg	394	197	197	0.002	1.44 (1.07,1.93)			T2D
5	Geokun Qiu et al. / 2016 / International Journal of Epidemiology	3118	1559	1559	0.003	1.26 (1.08, 1.46)			T2D
6	Jun Liu et al. / 2017/ Springer	2776	1205	1571	2.7 x 10 <sup>-20</sup>	2.4 (2.0, 2.9)			T2D
<b>TOTAIS</b>		<b>21626</b>	<b>4666</b>	<b>16960</b>					
7	Diane M. Libert et al. / 2018 / PeerJ	90	20	70	<0.0001			-	T2D
8	Xinfeng Liu et al. / 2016 / Nature	125	97	28	0.008			5.85 ± 1.47**	T2D + Coronary heart disease
9	Navdeep Gogna et al. / 2014 / Molecular BioSystems	293	165	128	0.0096155			1.98 ± 0.42	T2D low BMI
10	Ele Ferrannini et al. / 2013 / Diabetes (American diabetes association)	1308	47	1261	<0.003			72 [23]	T2D + Dysglycemia
11	Fengguo Xu et al. / 2013 / Joem	87	27	60	<0.001			1.30 (0.40)	T2D
12	Laura Del Coco et al. / 2019 / Clinical Medicine	33	26	7	1.15 x 10 <sup>-4</sup>			1.15 ± 0.24	T2D
13	Wenjuan Lin et al. / 2020 / Springer	84	42	42	0.0021			-	T2D

Table. 4 - Description of data included in meta-analysis

Metabolite	Author / year / journal	Participants (N)	T2D	No T2D	p-value	OR (95% IC) per SD	HR (95% CI) per SD	Média	OUTCOME
<b>Phenylalanine</b>									
1	Jordi Merino et al. / 2018 / Springer Nature	1150	95	1055	0.002		1.35 (1.11, 1.65)		T2D
2	Ari V. Ahola-Olli et al. / 2019 / Springer	11896	392	11504	5 x 10 <sup>-07</sup>	1.31 (1.18, 1.46)			T2D
3	Clara Barrios et al. / 2018 / nature	5764	926	4838	<0.001	-7.92 [-9.27, -6.57]			T2D + Nephropathy
4	Geokun Qiu et al. / 2016 / International Journal of Epidemiology	3118	1559	1559	0.29	1.08 (0.94, 1.24)			T2D
5	Lin Shi et al. / 2018 / Springer	503	187	316	0.172	1.18(0.96,1.45)			T2D
<b>TOTAIS</b>		<b>18610</b>	<b>1413</b>	<b>17397</b>					
6	Fengguo Xu et al. / 2013 / Joem	87	27	60	0.025			1.14 (0.21)	T2D
7	Zhi Yang Tam et al. / 2017 / nature	158	80	78	< 0.005			-	T2D
8	Navdeep Gogna et al. / 2014 / Molecular BioSystems	293	165	128	0.029161			1.95 ± 0.27	T2D low BMI
9	Diane M. Libert et al. / 2018 / PeerJ	90	20	70	<0.0001			-	T2D
10	Laura Del Coco et al. / 2019 / Clinical Medicine	33	26	7	2.54 x 10 <sup>-5</sup>			0.21 ± 0.04	T2D
11	Ele Ferrannini et al. / 2013 / Diabetes (American diabetes association)	1308	47	1261				55 [15]	T2D + Dysglycemia
<b>TOTAIS</b>		<b>661</b>	<b>318</b>	<b>343</b>					

(Continuação do apêndice III)

Table. 4 - Description of data included in meta-analysis

Metabolite	Author / year / journal	Participants (N)	T2D	No T2D	p-value	OR (95% IC) per SD	HR (95% CI) per SD	Média	OUTCOME
<b>Leucine</b>									
1	Casey M. Rebholz et al. / 2018 / Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature	2939	1126	1813	6.78 × 10 <sup>-6</sup>		2.37 (1.63, 3.45)		T2D
2	Lin Shi et al. / 2018 / Springer	503	187	316	0.001	1.7(1.31,2.21)			T2D
3	Yonghai Lu et al. / 2016 / Springer-Verlag Berlin Heidelberg	394	197	197	0.002	1.44 (1.07, 1.93)			T2D
4	Geokun Qiu et al. / 2016 / International Journal of Epidemiology	3118	1559	1559	0.003	1.26 (1.08, 1.46)			T2D
5	Ari V. Ahola-Olli et al. / 2019 / Springer	11896	392	11504	2 x 10 <sup>-08</sup>	1.33 (1.21 - 1.47)			T2D
6	Huan-Tang Lin et al. / 2019 / Journal of Clinical Medicine	80	40	40	0.036 *	1.004			T2D
					0.550	0.998		T2D + Retinopathy	
					0.080	0.995		T2D + Nephropathy	
					0.147	0.994		T2D + Neuropathy	
<b>TOTAIS</b>		<b>18850</b>	<b>3461</b>	<b>15389</b>					
7	Fengguo Xu et al. / 2013 / jcem	87	27	60	<0.001			2.06 (0.60)	T2D
8	Xinfeng Liu et al. / 2016 / Nature	125	97	28	0.002			0.66 ± 0.27**	T2D + Coronary heart disease
9	Navdeep Gogna et al. / 2014 / Molecular BioSystems	293	165	128	0.0006964			1.47 ± 0.41	T2D low BMI
10	Ele Ferrannini et al. / 2013 / Diabetes (American diabetes association)	1308	47	1261	0.004			145 [51]	T2D + Dysglycemia
11	Diane M. Libert et al. / 2018 / PeerJ	90	20	70	<0.0001			-	T2D
12	Laura Del Coco et al. / 2019 / Clinical Medicine	33	26	7	9.48 × 10 <sup>-6</sup>			1.64 ± 0.24	T2D
<b>TOTAIS</b>									

Table. 4 - Description of data included in meta-analysis

Metabolite	Author / year / journal	Participants (N)	T2D	No T2D	p-value	OR (95% IC) per SD	HR (95% CI) per SD	Média	OUTCOME
<b>Tyrosine</b>									
1	Samira Salihovic et al. / 2020 / Nature	1424	197	1227	0.769	1.04 (0.81, 1.32)			T2D
2	Lin Shi et al. / 2018 / Springer	503	187	316	0.010	1.44 (1.13, 1.84)			T2D
3	Jun Ho Yun et al. / 2019 / PLOS ONE	133	133	0	7.00 x 10 <sup>-05</sup>	2.32 (1.56-3.59)			T2D with normal levels HbA1c (≤ 6%)
4	Geokun Qiu et al. / 2016 / International Journal of Epidemiology	3118	1559	1559	0.146	1.19 (0.94, 1.49)			T2D
5	Ari V. Ahola-Olli et al. / 2019 / Springer	11896	392	11504	0.002	1.18 (1.06, 1.32)			T2D
6	Jun Liu et al. / 2017 / Springer	2776	1205	1571	1.6 × 10 <sup>-5</sup>	1.5 (1.2, 1.7)			T2D
7	Jun Ho Yun et al. / 2020 / PLOS ONE	317	327	0	1.42E-06	0.43 (0.31 - 0.57)			T2D + Retinopathy
8	Huan-Tang Lin et al. / 2019 / Journal of Clinical Medicine	80	40	40	0.048 *	1.010			T2D
					0.628	1.003		T2D + Retinopathy	
					0.014 *	0.984		T2D + Nephropathy	
					0.677	1.004		T2D + Neuropathy	
<b>TOTAIS</b>		<b>19850</b>	<b>3673</b>	<b>16177</b>					
9	Wenjuan Lin et al. / 2020 / Springer	84	42	42	1 x 10 <sup>-06</sup>			-	T2D
10	Fengguo Xu et al. / 2013 / jcem	87	27	60	0.029			1.08 (0.28)	T2D
11	Xinfeng Liu et al. / 2016 / Nature	125	97	28	0.001			1.86 ± 0.92**	T2D + Coronary heart disease
12	Ele Ferrannini et al. / 2013 / Diabetes (American diabetes association)	1308	47	1261	<0.01			61 [12]	T2D + Dysglycemia
13	Laura Del Coco et al. / 2019 / Clinical Medicine	33	26	7	4.09 × 10 <sup>-5</sup>			0.14 ± 0.04	T2D
<b>TOTAIS</b>		<b>1637</b>	<b>239</b>	<b>1398</b>					

## (Continuação do apêndice III)

Table. 4 - Description of data included in meta-analysis

Metabolite	Author / year / journal	Participants (N)	T2D	No T2D	p-value	OR (95% IC) per SD	HR (95% CI) per SD	Média	OUTCOME
<b>Alanine</b>									
1	Lin Shi et al. / 2018 / Springer	503	187	316	0.021	1.3 (1.06,1.58)			T2D
2	Geokun Qiu et al. / 2016 / International Journal of Epidemiology	3118	1559	1559	0.023	1.16 (1.02, 1.31)			T2D
3	Huan-Tang Lin et al. / 2019 / Journal of Clinical Medicine	80	40	40	0.004 *	0.998			T2D
					0.929	1.000		T2D + Retinopathy	
					0.829	1.000		T2D + Nephropathy	
					0.513	0.999		T2D + Neuropathy	
<b>TOTAIS</b>		<b>3621</b>	<b>1746</b>	<b>1875</b>					
4	Fengguo Xu et al. / 2013 / jcem	87	27	60	<0.001			5.05 (1.15)	T2D
5	Xinfeng Liu et al. / 2016 / Nature	125	97	28	0.001			27.19 ± 14.02**	T2D + Coronary heart disease
6	Ele Ferrannini et al. / 2013 / Diabetes (American diabetes association)	1308	47	1261	<0.001			371 [126]	T2D + Dysglycemia
7	Laura Del Coco et al. / 2019 / Clinical Medicine	33	26	7	6.89 × 10 <sup>-7</sup>			1.14 ± 0.38	T2D
8	Wenjuan Lin et al. / 2020 / Springer	84	42	42	0.00016			-	T2D
<b>TOTAIS</b>		<b>1637</b>	<b>239</b>	<b>1398</b>					

Table. 4 - Description of data included in meta-analysis

Metabolite	Author / year / journal	Participants (N)	T2D	No T2D	p-value	OR (95% IC) per SD	HR (95% CI) per SD	Média	OUTCOME
<b>Glycine</b>									
1	Yonghai Lu et al. / 2016 / Springer-Verlag Berlin Heidelberg	394	197	197	<0.001	2.66 (1.72, 4.12)			T2D
2	Jun Ho Yun et al. / 2019 / PLOS ONE	133	133	0	4.00 × 10 <sup>-04</sup>	2.04 (1.39, 3.09)			T2D with normal levels HbA1c (≤ 6%)
3	Clara Barrios et al. / 2018 / nature	5764	926	4838	<0.001	-8.37 [-9.73, -7.02]			T2D + Nephropathy
4	Jordi Merino et al. / 2018 / Springer Nature	1150	95	1055	2.84 × 10 <sup>-6</sup>		0.65 (0.54, 0.78)		T2D
5	Danxia Yu et al. / 2015 / Springer	976	141	835	?	0.67 (0.52, 0.87)	0.58 (0.46, 0.75)*		Associated with incident T2D
<b>TOTAIS</b>		<b>7441</b>	<b>1351</b>	<b>6090</b>					
6	Xinfeng Liu et al. / 2016 / Nature	125	97	28	0.001			55.02 ± 13.66	T2D + Coronary heart disease
7	Al-hua Zhang et al. / 2013 / J Physiol Biochem; Springer				0.01			-	T2D
8	Ele Ferrannini et al. / 2013 / Diabetes (American diabetes association)	1308	47	1261	0.01			174 [60]	T2D + Dysglycemia
9	Wenjuan Lin et al. / 2020 / Springer	84	42	42	0.0000019			-	T2D
<b>TOTAIS</b>		<b>1517</b>	<b>186</b>	<b>1331</b>					

## (Continuação do apêndice III)

Table. 4 - Description of data included in meta-analysis

Metabolite	Author / year / journal	Participants (N)	T2D	No T2D	p-value	OR (95% IC) per SD	HR (95% CI) per SD	Média	OUTCOME
<b>Glycerol</b>									
1	Ari V. Ahola-Olli et al. / 2019 / Springer	11896	392	11504	1x10-04	1.22 (1.10, 1.35)			T2D
2	Clara Barrios et al. / 2018 / nature	5764	926	4838	<0.001	-5.57 [-7.37, -3.77]			T2D + Nephropathy
3	Jun Liu et al. / 2017/ Springer	2776	1205	1571	2.1x10 <sup>-14</sup>	2.3 (1.8, 2.8)			T2D
4	Yonghai Lu et al. / 2016 / Springer-Verlag Berlin Heidelberg	394	197	197	<0.001	0.48 (0.33, 0.70)			T2D
<b>TOTAIS</b>		<b>20830</b>	<b>2720</b>	<b>18110</b>					
5	Navdeep Gogna et al. / 2014 / Molecular BioSystems	293	165	128	0.000061967			2.22 ± 0.68	T2D low BMI
6	Wenjuan Lin et al. / 2020 /Springer	84	42	42	0.00059			-	T2D
<b>TOTAIS</b>		<b>377</b>	<b>207</b>	<b>170</b>					
<b>Lysine</b>									
1	Jun Ho Yun et al. / 2019 /PLOS ONE	133	51	82	4.00E-06	3.22 (2.02-5.46)			T2D normal HbA1c
2	Filip Ottosson et al. / 2020 / MDPI Metabolites	918	743	175	2.0 × 10 <sup>-4</sup>		0.80 (0.71-0.90)		T2D + CVD
3	Jun Ho Yun et al. / 2020 / PLOS ONE	317	327	0	2.9E-03	0.53 (0.4 - 0.69)			T2D + Retinopathy
<b>TOTAIS</b>		<b>1368</b>	<b>1121</b>	<b>257</b>					
4	Al-hua Zhang et al. / 2013 / J Physiol Biochem; Springer	123	81	42	0.02			-	T2D
5	Navdeep Gogna et al. / 2014 / Molecular BioSystems	310	165 (+ 17 pre-T2D)	128	0.0098384			1.25 ± 0.33	T2D + low BMI
6	Ele Ferrannini et al. / 2013 / Diabetes (American diabetes association)	1308	47	1261	?(ns)			156 [35]	T2D + Dysglycemia
7	Laura Del Coco et al. / 2019 / Clinical Medicine	33	26	7	6.20 × 10 <sup>-7</sup>			0.29 ± 0.05	T2D
8	Wenjuan Lin et al. / 2020 /Springer	84	42	42	0.0063			-	T2D
<b>TOTAIS</b>		<b>1858</b>	<b>▲</b>	<b>1522</b>					

(Continuação do apêndice III)

**VALINA (OR / HR)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	OR	Limite Inferior OR	Limite Superior OR	HR	Limite Inferior HR	Limite Superior HR	Margem de Erro	Variância OR / HR	Desvio Padrão OR / HR	P-value	Qualidade do artigo	Relação com DT2	Grupos de comparação	OUTCOME
Casey M. Rebholz et al.	2018	2939				2,41	1,56	3,72	2,16	892,349437734277	29,672218449582	6,25 x 10 <sup>-5</sup>	5	Associado à incidência de DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Lin SH et al.	2018	503	1,31	1,05	1,62				0,57	10,6351975739275	3,2611650638886	0,026	5	> concentração elevada associação com risco de DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Yonghai Lu et al.	2016	394	1,66	1,21	2,26				1,05	28,2684948979591	5,31681247534284	<0,001	4	> concentração "base line", risco aumentado DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Jun Ho Yun et al.	2019	133	2,84	1,86	4,57				2,71	63,5650054664723	7,97276648764231	5,00 x 10 <sup>-06</sup>	5	> concentração DT2; > concentração grupo HbA1c normal em relação ao grupo com > HbA1c	T2D + normal HbA1c	T2D with normal levels HbA1c (≤ 6%)
Gaokun Qiu et al.	2016	3118	1,14	1,00	1,29				0,29	17,0647516659725	4,1309504552141	0,050	4	Associado ao risco de desenvolver DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Ari V. Ahola-Olli et al.	2019	11896	1,20	1,08	1,34				0,26	52,3239862557268	7,23415414529256	0,001	4	Risco aumentado DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Danxia Yu et al.	2015	976	1,19	0,90	1,58				0,68	29,3694294044149	5,41935891797605	?	5		T2D vs non-T2D	T2D

**VALINA (Média)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	Média	Desvio padrão	Variância	Grupos de Comparação	OUTCOME
Fengguo Xu et al.	2013	87	4,04	1,28	1,6384	T2D vs non-T2D	T2D
Fengguo Xu et al.	2013	87	3,46	0,62	0,3844	IFD vs non-T2D	T2D+IFD
Xinfeng Liu et al.	2016	125	10,42	2,02	4,0804	T2D vs non-T2D	T2D + Coronary heart disease
Xinfeng Liu et al.	2016	125	17,89	4,28	18,3184	T2D vs T2D+CHD	T2D + Coronary heart disease
Ela Ferrarini et al.	2013	1308	217	69	4761	T2D vs non-T2D	T2D + Dysglycemia
Laura Del Cocco et al.	2019	33	1,10	0,19	0,0361	T2D + complications vs non-T2D	T2D
Nandeep Gogna et al.	2014	293	1,69	0,32	0,1024	T2D vs non-T2D	T2D

**ISOLEUCINA (OR / HR)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	OR	Limite Inferior OR	Limite Superior OR	HR	Limite Inferior HR	Limite Superior HR	Margem de Erro	Variância OR / HR	Desvio Padrão OR / HR	P-value	Qualidade do artigo	Relação com DT2	Grupos de Comparação	OUTCOME
Ari V. Ahola-Olli et al.	2019	11896	1,33	1,21	1,47				0,26	52,3239862557268	7,23415414529256	1 x 10 <sup>-06</sup>	4	Risco aumentado DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Casey M. Rebholz et al.	2018	2939				2,96	2,02	4,35	2,33	1038,3393052374	32,2232727269811	3,18 x 10 <sup>-8</sup>	5	Associado à incidência de DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Lin SH et al.	2018	503	1,7	1,31	2,21				0,9	26,5143429820908	5,14820799561358	0,001	5	> concentração; marcador preditivo; elevada associação com risco de DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Yonghai Lu et al.	2016	394	1,44	1,07	1,93				0,86	18,9636089129529	4,35472258683207	0,002	4	> concentração "base line", risco aumentado DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Gaokun Qiu et al.	2016	3118	1,26	1,08	1,46				0,38	29,3002394835485	5,41296956240736	0,003	4	Associado ao risco de desenvolver DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Jun Lu et al.	2017	2776	2,4	2,0	2,9				0,9	146,329654310703	12,0966794745791	2,7 x 10 <sup>-20</sup>	5	Risco aumentado hipertensão; Preditor de DT2 (independentemente de outros fatores)	T2D vs non-T2D	T2D

**ISOLEUCINA (Média)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	Média	Desvio padrão	Variância	Grupos de Comparação	OUTCOME
Xinfeng Liu et al.	2016	125	5,85	1,47	2,1600	T2D vs non-T2D	T2D + Coronary heart disease
Xinfeng Liu et al.	2016	125	6,78	1,20	1,44	T2D vs T2D+CHD	T2D + Coronary heart disease
Ela Ferrarini et al.	2013	1308	72	23	529	T2D vs non-T2D	T2D + Dysglycemia
Fengguo Xu et al.	2013	87	1,30	0,40	0,16	T2D vs non-T2D	T2D
Fengguo Xu et al.	2013	87	1,03	0,24	0,0576	IFD vs non-T2D	T2D+IFD
Laura Del Cocco et al.	2019	33	1,15	0,24	0,0576	T2D + complications vs non-T2D	T2D
Nandeep Gogna et al.	2014	293	1,98	0,42	0,1764	T2D vs non-T2D	T2D

**FENILALANINA (OR / HR)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	OR	Limite Inferior OR	Limite Superior OR	HR	Limite Inferior HR	Limite Superior HR	Margem de Erro	Variância OR / HR	Desvio Padrão OR / HR	P-value	Qualidade do artigo	Relação com DT2	Grupos de comparação	OUTCOME
Jordi Merino et al.	2018	1150				1,35	1,11	1,65	0,54	21,8229383590171	4,67150279449955	0,002	5	Associado ao risco DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Ari V. Ahola-Olli et al.	2019	11896	1,31	1,18	1,46				0,28	60,6938775510204	7,79062754539199	5 x 10 <sup>-07</sup>	4	Risco aumentado DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Clara Barrios et al.	2018	5764	2,36	1,91	2,90				0,89	367,639551228653	19,1739289469625	<0,001	5	Negativamente associado à função renal na DT2	T2D vs non-T2D	T2D + Nephropathy
Gaokun Qiu et al.	2016	3118	1,08	0,94	1,24				0,3	18,2619221157851	4,27339702295318	0,29			T2D vs non-T2D	T2D
Lin SH et al.	2018	503	1,16	0,96	1,45				0,49	7,8693750000003	2,80345768650073	0,172			T2D vs non-T2D	T2D

**FENILALANINA (Média)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	Média	Desvio padrão	Variância	Grupos de Comparação	OUTCOME
Fengguo Xu et al.	2013	87	1,14	0,21	0,0441	T2D vs non-T2D	T2D
Fengguo Xu et al.	2013	87	1,09	0,29	0,0841	IFD vs non-T2D	T2D+IFD
Laura Del Cocco et al.	2019	33	0,21	0,04	0,0016	T2D + complications vs non-T2D	T2D
Ela Ferrarini et al.	2013	1308	55	15	225	T2D vs non-T2D	T2D + Dysglycemia
Nandeep Gogna et al.	2014	293	1,95	0,27	0,0729	T2D vs non-T2D	T2D

(Continuação do apêndice III)

**LEUCINA (OR / HR)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	OR	Limite Inferior OR	Limite Superior OR	HR	Limite Inferior HR	Limite Superior HR	Margem de Erro	Variância OR / HR	Desvio Padrão OR / HR	P-value	Qualidade do artigo	Relação com DT2	Grupos de comparação	OUTCOME
Casey M. Rebholz et al.	2018	2959				2,37	1,63	3,45	1,82	633,534438775509	25,1701100270839	6,78 x 10 <sup>-6</sup>	5	Associado à incidência de DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Lin Shi et al.	2018	503	1,7	1,31	2,21				0,9	26,514349820908	5,14920799561358	0,001	5	> concentração; elevada associação com risco de DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Yonghai Lu et al.	2016	394	1,44	1,07	1,93				0,86	18,9636089129529	4,35472259885207	0,002	4	> concentração "base line"; risco aumentado DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Gaokun Qiu et al.	2016	3118	1,26	1,08	1,46				0,38	29,3002394835485	5,41299956240736	0,003	4	Associado ao risco de desenvolver DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Ari V. Ahola-Olli et al.	2019	11896	1,33	1,21	1,47				0,26	52,8329862557268	7,23415414929256	2 x 10 <sup>-08</sup>	4	Risco aumentado DT2	T2D vs non-T2D	T2D

**LEUCINA (Média)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	Média	Desvio padrão	Variância	Grupos de Comparação	OUTCOME
Fengguo Xu et al.	2013	87	2,06	0,60	0,36	T2D vs non-T2D	T2D
Fengguo Xu et al.	2013	87	1,87	0,41	0,1681	IFD vs non-T2D	T2D+IFD
Xinfeng Liu et al.	2016	125	0,66	0,27	0,0729	T2D vs non-T2D	T2D + Coronary heart disease
Xinfeng Liu et al.	2016	125	0,74	0,34	0,1156	T2D vs T2D+CHD	T2D + Coronary heart disease
Eie Ferrannini et al.	2013	1308	1,45	0,51	0,2601	T2D vs non-T2D	T2D + Dysglycemia
Laura Del Coco et al.	2019	33	1,64	0,24	0,0576	T2D + complications vs non-T2D	T2D
Nandeepp Gogna et al.	2014	293	1,47	0,41	0,1681	T2D vs non-T2D	T2D

**TIROSINA (OR / HR)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	OR	Limite Inferior OR	Limite Superior OR	Margem de Erro	Variância OR	Desvio Padrão OR	P-value	Qualidade do artigo	Relação com DT2	Grupos de comparação	OUTCOME
Samira Salthovic et al.	2020	1424	1,04	0,81	1,32	0,51	24,1033944189921	4,90952079321313	0,769	4	Associado à prevalência DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Lin Shi et al.	2018	503	1,44	1,13	1,84	0,71	16,5010867867555	4,06215297431738	0,010	5	> concentração; metabolismo preditivo; elevada associação com risco de DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Jun Ho Yun et al.	2019	133	2,32	1,56	3,59	2,03	35,6674107142858	5,97221991509738	7,00 x 10 <sup>-05</sup>	5	> concentração DT2; > concentração grupo HbA1c normal em relação ao grupo com > HbA1c	T2D + normal HbA1c	T2D with normal levels HbA1c (≤ 6%)
Ari V. Ahola-Olli et al.	2019	11896	1,18	1,06	1,32	0,26	52,3329862557268	7,23415414929256	0,002	4	Risco aumentado DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Jun Liu et al.	2017	2776	1,5	1,2	1,7	0,5	45,1634735526864	6,72037746587729	1,6x10 <sup>-5</sup>	5	Preditor DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Jun Ho Yun et al.	2020	317	0,43	0,31	0,57	0,26	1,3945491461891	1,18091030404053	1,42E-06	5	Associado à DT2	T2D non-R vs T2D-R	T2D + Retinopathy
Gaokun Qiu et al.	2016	3118	1,19	0,94	1,49	0,55	61,3803493336109	7,83456120874749	0,146			T2D vs non-T2D	T2D

**TIROSINA (Média)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	Média	Desvio padrão	Variância	Grupos de Comparação	OUTCOME
Fengguo Xu et al.	2013	87	1,08	0,28	0,0784	T2D vs non-T2D	T2D
Fengguo Xu et al.	2013	87	1,06	0,28	0,0784	IFD vs non-T2D	T2D+IFD
Xinfeng Liu et al.	2016	125	1,86	0,92	0,8464	T2D vs non-T2D	T2D + Coronary heart disease
Xinfeng Liu et al.	2016	125	2,75	0,89	0,7921	T2D vs T2D+CHD	T2D + Coronary heart disease
Eie Ferrannini et al.	2013	1308	61	12	144	T2D vs non-T2D	T2D + Dysglycemia
Laura Del Coco et al.	2019	33	0,14	0,04	0,0016	T2D + complications vs non-T2D	T2D

**ALANINA (OR / HR)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	OR	Limite Inferior OR	Limite Superior OR	Margem de Erro	Variância OR	Desvio Padrão OR	P-value	Qualidade do artigo	Relação com DT2	Grupos de comparação	OUTCOME
Lin Shi et al.	2018	503	1,3	1,06	1,58	0,52	8,85120783007082	2,97509795302118	0,021	5	> concentração; elevada associação com risco de DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Gaokun Qiu et al.	2016	3118	1,16	1,02	1,31	0,29	17,0647516659725	4,13095045552141	0,023	4	Associado ao risco de desenvolver DT2	T2D vs non-T2D	T2D

**ALANINA (Média)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	Média	Desvio padrão	Variância	Grupos de Comparação	OUTCOME
Fengguo Xu et al.	2013	87	5,05	1,15	1,3225	T2D vs non-T2D	T2D
Fengguo Xu et al.	2013	87	4,68	1,24	1,5376	IFD vs non-T2D	T2D+IFD
Xinfeng Liu et al.	2016	125	27,19	14,02	196,5604	T2D vs non-T2D	T2D + Coronary heart disease
Xinfeng Liu et al.	2016	125	36,07	9,34	87,2356	T2D vs T2D+CHD	T2D + Coronary heart disease
Eie Ferrannini et al.	2013	1308	371	128	16384	T2D vs non-T2D	T2D + Dysglycemia
Laura Del Coco et al.	2019	33	1,14	0,38	0,1444	T2D + complications vs non-T2D	T2D

(Continuação do apêndice III)

**GLICINA (OR / HR)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	OR	Limite Inferior OR	Limite Superior OR	HR	Limite Inferior HR	Limite Superior HR	Margem de Erro	Variância OR / HR	Desvio Padrão OR / HR	P-value	Qualidade do artigo	Relação com DT2	Grupos de comparação	OUTCOME
Yonghai Lu et al.	2016	394	2,66	1,72	4,12				2,4	147,688463140358	12,1527142293546	<0,001	4	> concentração; risco aumentado DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Jun Ho Yun et al.	2019	133	2,04	1,39	3,09				1,7	25,013661807581	5,00136643136234	4,00 x 10 <sup>-4</sup>	5	> concentração	T2D + normal HbA1c	T2D with normal levels HbA1c (≤ 5%)
Clara Barrios et al.	2018	5764	2,55	2,05	3,17				1,12	470,530912244898	21,6917175955455	<0,001	5		T2D vs non-T2D	T2D + Nephropathy
Jordi Merino et al.	2018	1150				0,65	0,65	0,78	0,13	1,2647724906289	1,12462104312026	2,84 x 10 <sup>-6</sup>	5	em relação ao grupo com > HbA1c	T2D vs non-T2D	T2D

**GLICINA (Média)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	Média	Desvio padrão	Variância	Grupos de Comparação	OUTCOME
Xinling Liu et al.	2016	125	55,02	13,66	186,5956	T2D vs non-T2D	T2D + Coronary heart disease
Xinling Liu et al.	2016	125	42,61	11,46	131,3316	T2D vs T2D+CHD	T2D + Coronary heart disease
Ele Ferrarini et al.	2013	34	174	60	3600	T2D vs non-T2D	T2D + Dysglycemia

**Glicerol**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	OR	Limite Inferior OR	Limite Superior OR	Margem de Erro	Variância OR	Desvio Padrão OR	P-value	Qualidade do artigo	Relação com DT2	Grupos de comparação	OUTCOME
Ali V. Ahola-Olli et al.	2019	11896	1,22	1,10	1,35	0,25	48,3847875885048	6,95591745124285	1x10 <sup>-4</sup>	4	Risco aumentado DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Clara Barrios et al.	2018	5764	2,12	1,56	2,88	1,32	653,581424406495	25,56523859475	<0,001	5	Negativamente associado função renal	T2D vs non-T2D	T2D + Nephropathy
Jun Liu et al.	2017	2776	2,3	1,8	2,8	1	180,653894210746	13,4407549717546	2,1x10 <sup>-14</sup>	5	Inconsistente com resultados prévios. Associado à prevalência DT2	T2D vs non-T2D	T2D
Yonghai Lu et al.	2016	394	0,48	0,33	0,70	0,37	3,51016503540192	1,87354344369217	<0,001	4	> concentração; risco aumentado DT2	T2D vs non-T2D	T2D

**GLICEROL (Média)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	Média	Desvio padrão	Variância	Grupos de Comparação	OUTCOME
Navdeep Gogna et al.	2014	293	2,22	0,68	0,4624	T2D vs non-T2D	T2D

**LISINA**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	OR	Limite Inferior OR	Limite Superior OR	HR	Limite Inferior HR	Limite Superior HR	Margem de Erro	Variância OR / HR	Desvio Padrão OR / HR	P-value	Qualidade do artigo	Relação com DT2	Grupos de comparação	OUTCOME
Jun Ho Yun et al.	2019	133	3,22	2,02	5,46				3,44	102,422746524782	10,1204120728744	4,00E-06	5	Associado à DT2	T2D + normal HbA1c	T2D with normal levels HbA1c (≤ 5%)
Filip Othsson et al.	2020	918				0,80	0,71	0,90	0,19	2,1566046230738	1,46855046297812	2,0 x 10 <sup>-4</sup>	5	Associado à DT2	T2D-CVD vs non-T2D	T2D-CVD
Jun Ho Yun et al.	2020	317	0,63	0,49	0,81				0,32	2,11245314452912	1,45342806651142	2,8E-03	5	Associado à DT2	T2D non-R vs T2D-R	T2D + Retinopathy

**LISINA (Média)**

Autor	Ano	Dimensão total da amostra	Média	Desvio padrão	Variância	Grupos de Comparação	OUTCOME
Ele Ferrarini et al.	2013	1308	156	35	1225	T2D vs non-T2D	T2D + Dysglycemia
Laura Del Coco et al.	2019	33	0,29	0,05	0,0025	T2D + complicações vs non-T2D	T2D
Navdeep Gogna et al.	2014	293	1,25	0,33	0,1089	T2D vs non-T2D	T2D



Randomised Controlled Trial

Section A: Is the basic study design valid for a randomised controlled trial? Section B: Was the study methodologically sound? Section C: What are the results? Section D: Will the results help locally?

Article	DOI	Question 1		Question 2		Question 3		Question 4		Question 5		Question 6		Question 7		Question 8		Question 9		Question 10		Question 11		TOTAL SCORE	SCORE ESCALA ESCALA 0-5	SCORE ESCALA 0-5 (normalizado)
		Score	Description	Score	Description	Score	Description	Score	Description	Score	Description	Score	Description	Score	Description	Score	Description	Score	Description	Score	Description	Score	Description			
Liang Sun et al.	10.2337/66.16-0232	2		2		2		2		2		2		2		2		2		2		2		21	4,77272727	5
Fengguo Xu et al.	10.1210/jc.2012.4132	2		2		1		1		0		2		2		2		2		1		2		17	3,86383636	4
Mairine M. Bos et al.*	10.1007/s11366-020-01653-7	2		0	Not shown in table	2		2		1		2		2		2		2		2		2		19	4,31818181	4
Beatrix Garcia-Fonseca et al.*	10.1016/j.jabmt.2015.10.000	2		1		2		2		2		2		2		2		2		2		2		19	4,31818181	4
Al-Hua Zhang et al.	10.1007/s11305-013-0286-z	2		1		2		2		2		1		2		2		2		2		2		19	4,31818181	4
Nardeep Gogro et al.	10.1039/c4m00502d	2		1		2		2		2		2		2		2		2		2		2		20	4,54545454	5
Cbra Borrice et al.*	10.1038/s41588-018-33307-z	2		2		2		2		2		2		2		2		2		2		2		22	5	5
Diane M. Libert et al.	10.7717/beej.15410	2		2		2		2		0		2		2		2		2		2		2		19	4,31818181	4
Bright Kwoke et al.	10.1210/jc.2015-4133	2		2		2		2		0		2		2		2		2		2		2		20	4,54545454	5
Judit Bere et al.	10.1159/000445759	2		1		2		2		1		2		2		2		2		2		1		17	3,86383636	4