**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

PAULA TAKAHASHI

**Perfis de expressão gênica e possíveis interações entre microRNAs
e mRNAs em Diabetes Mellitus tipo 1 com enfoque em resposta ao
estresse oxidativo e reparo do DNA**

Ribeirão Preto

2014

PAULA TAKAHASHI

Perfis de expressão gênica e possíveis interações entre microRNAs e mRNAs em Diabetes Mellitus tipo 1 com enfoque em resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de Concentração: Genética

Orientadora: Prof^a Dr^a Elza Tiemi Sakamoto Hojo

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Takahashi, Paula

Perfis de expressão gênica e possíveis interações entre microRNAs e mRNAs em Diabetes Mellitus tipo 1 com enfoque em resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA. Ribeirão Preto, 2014.

215 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP. Área de Concentração: Genética.

Orientadora: Sakamoto-Hojo, Elza Tiemi.

1. Diabetes Mellitus tipo 1. 2. Perfis de expressão gênica. 3. MicroRNAs. 4. Resposta ao estresse oxidativo 5. Reparo do DNA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

TAKAHASHI, Paula. Perfis de expressão gênica e possíveis interações entre microRNAs e mRNAs em Diabetes Mellitus tipo 1 com enfoque em resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Genética

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. N° 2008/56594-8 e 2010/12069-7).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.
- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP.

Dedico especialmente este trabalho aos meus pais e meu irmão, por todo o amor, apoio e incentivo durante todas as etapas de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Elza Tiemi Sakamoto Hojo**, pela orientação do presente trabalho, amizade, paciência, apoio, respeito, carinho, dedicação e também pela imensa contribuição para meu amadurecimento profissional e pessoal. Muito obrigada!

À **Prof^a. Dr^a. Catarina Satie Takahashi** pelo apoio, carinho, simpatia e pelos momentos de descontração, risadas e comilanças no laboratório.

Aos **Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior**, chefe do Departamento de Genética da FMRP-USP, **Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Martelli** (vice-chefe) e **Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões** (ex-chefe) pela atenção e apoio prestados.

Aos **Prof^a. Dr^a. Silvana Giuliatti** coordenadora do curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética da FMRP-USP, **Prof^a. Dr^a. Ester Silveira Ramos** (vice-coordenadora) e **Prof. Dr. Ademilson Espencer E. Soares** (ex-coordenador) pela atenção, apoio, dedicação à pós-graduação e pela simpatia.

Aos **Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior**, **Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi** e respectivos laboratórios pela imensa colaboração no meu trabalho. Em especial, **Adriane Evangelista**, **Renata Almeida**, **Amanda Riccardi**, **Milena Pereira**, **Janaína Dernowsek**, **Ernna Oliveira**, **Nicole Pezzi** e **Diane Rassi** pela ótima convivência e troca de ensinamentos.

Às **Prof^a. Dr^a. Maura Helena Manfrin**, **Prof^a. Dr^a. Nilce Maria Martinez Rossi** e **Prof^a. Dr^a. Zilá Luz Paulino Simões**, por gentilmente disponibilizarem o uso de alguns aparelhos de seus laboratórios, e aos integrantes dos mesmos por sempre me receberem bem.

Aos **Prof. Dr. Milton César Foss** e **Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Foss Freitas**, por disponibilizarem o ambulatório de endocrinologia para a seleção e coleta de amostras e pela colaboração no projeto.

Ao **Departamento de Genética** da FMRP-USP pela estrutura oferecida para o desenvolvimento do presente trabalho.

À **FAPESP** pela concessão da bolsa de doutorado e suporte financeiro oferecido para a realização do presente projeto.

À **CAPES** por alguns meses de bolsa de doutorado e suporte financeiro oferecido, bem como ao **CNPq** e **FAEPA**.

A todos os voluntários que aceitaram participar do presente trabalho. Muito obrigada!

Aos funcionários do Departamento de Genética da FMRP-USP, **Silvia Consiglieri**, **Gustavo Medeiros**, **Ana Cláudia de Souza** e, em especial **Susie A. P. Nalon** por toda a atenção, apoio, ajuda, dedicação e simpatia.

Aos **professores membros da banca examinadora**, pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

Aos técnicos do laboratório de Citogenética e Mutagênese do Departamento de Genética da FMRP-USP, **Luiz Augusto da Costa Júnior** e **Sueli Aparecida Neves**, pelo apoio técnico, carinho, companheirismo, simpatia e grande amizade.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Mutagênese, pelo excelente ambiente de trabalho, pela amizade e pelos momentos únicos de descontração! **Danilo**, por todos os ensinamentos, conselhos, orientações e discussões produtivas, fundamentais para a execução deste trabalho, além da companhia e apoio; **Giovana** (gracinha roxa), por ter me enturmado no lab desde o primeiro dia, pela amizade que se fortalece cada dia mais, por sempre estar ao meu lado me apoiando e me dando conselhos profissionais e pessoais; **Paulo** (Cop), pelos desabafos e pelas orientações e discussões produtivas, apesar de me fazer passar frio; **Léo**, pelos desabafos e pelas risadas; **Ana Paula**, pelas orientações e discussões produtivas; **Ana Clara**, pelas conversas e risadas; **Verônica**, pelas conversas e ótima convivência; **João Paulo** (Johnny), por ser naturalmente engraçado; **Andrés**,

William, Sara e Murilo, pela ótima convivência. Aos ex-alunos do lab: **Fernanda C.** pelas conversas produtivas e ótima convivência; **Flavinha**, pelo bom humor e simpatia e, apesar de não estar mais no lab, continua sendo minha outra gracinha roxa; **Felipe** (Magal), **Tiago, Gustavo, Fernanda P.** e **Raquel**, pela ótima convivência. Só tenho a agradecer!

Aos **Danilo, Giovana e Paulo**, pela correção da tese e pelos vários momentos de comilança, fofocas e risadas. Muito obrigada!

A todos os integrantes do laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos (técnicos, pós-graduandos, pós-doutorandos), por sempre me receberem tão bem, em especial **Larissa, Nalu e Gabi**, pelos ensinamentos e amizade.

Ao **Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes** e à **Flávia Freitas** pela ajuda, disponibilidade e simpatia.

Aos integrantes do laboratório de HLA do Hemocentro da FMRP-USP, em especial **Neifi Deghaide**, pelo apoio e simpatia.

À **Cleusa**, por zelar pelo laboratório com tanto carinho.

A todos meus amigos, principalmente: **Paty, Renata, Gargi, Jenny, Dri**, meus amigos de infância **Ná, Lê e Gutinho**, aos casais **Fernando e Simone** e **Regina e Chiquetti**, além da grande amizade, minha gratidão pelos conselhos, conversas, apoio e momentos de descontração. Muito obrigada!

Aos meus familiares, especialmente minha avó **Tomoko**, por todo o amor, carinho, cuidado e dedicação aos netos. Te amo vó!

Ao meu querido irmão **Arthur** (Tuco), por todo o apoio, o amor, as conversas e os conselhos, por sempre conseguir me acalmar e me fazer dar risada. Por ser um exemplo de profissionalismo e de caráter. Amo você e sinto muitas saudades!

Aos meus pais **Paulo** (papito) e **Rosa** (mamis), por todos os ensinamentos, carinho, amor e exemplo de vida! Por estarem ao meu lado em todos os momentos e por tudo o que fazem e sempre fizeram para me verem bem e feliz. Tudo o que conquistei até hoje devo a vocês. Os melhores pais do mundo! Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu namorado **Danilo** (Fofinho), por todos os momentos felizes que passamos juntos, pelo amor, carinho, respeito e cumplicidade mútuos. Obrigada por toda a compreensão, paciência, incentivo e por sempre se assegurar de que estou bem. Obrigada por toda a ajuda durante meu doutorado, incluindo as etapas finais de conclusão da tese. Amo você!

RESUMO

TAKAHASHI, P. **Perfis de expressão gênica e possíveis interações entre microRNAs e mRNAs em Diabetes Mellitus tipo 1 com enfoque em resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA.** 2014, 215f, Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) resulta de um ataque autoimune contra as células β pancreáticas, extinguindo a produção de insulina e levando à hiperglicemia. Evidências indicam uma associação entre o estresse oxidativo (que pode causar danos no DNA) e o DM1, sendo que apenas alguns trabalhos da literatura relataram a expressão de genes relacionados à respostas ao estresse oxidativo e reparo do DNA em DM1. Ainda, os microRNAs (reguladores pós-transcricionais da expressão gênica) estão envolvidos em vários processos biológicos e condições patológicas, mas informação sobre a expressão dos microRNAs em DM1 ainda é escassa. A fim de proporcionar um melhor entendimento sobre as vias de regulação de genes participantes de processos biológicos relevantes para o DM1, o presente estudo consistiu em analisar os perfis de expressão gênica (método de microarranjos) de microRNAs e de mRNAs (bem como de algumas proteínas) provenientes de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) de pacientes DM1 (n=19) em comparação com indivíduos saudáveis não diabéticos (n=11), dando maior enfoque a genes associados à resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA. Os resultados de expressão obtidos pelo método de microarranjos apontaram 44 microRNAs diferencialmente expressos (35 induzidos e nove reprimidos) nos pacientes DM1 e esses microRNAs apresentaram grande especificidade ao estratificar pacientes DM1 dos controles, incluindo hsa-miR-101, hsa-miR148a, hsa-miR-27b e hsa-miR-424, cujos dados de expressão foram confirmados por qRT-PCR. A análise funcional dos genes-alvo dos microRNAs, tanto dos induzidos quanto dos reprimidos, apontou 22 e 12 vias KEGG significativamente enriquecidas, respectivamente, incluindo vias relacionadas ao câncer. Com relação à análise de expressão de mRNAs, 277 genes diferencialmente expressos foram identificados nos pacientes DM1, sendo que 52% deles são potenciais alvos dos microRNAs diferencialmente expressos nos pacientes DM1. Dentre esses alvos foram encontrados genes candidatos ao desenvolvimento da doença, assim como genes implicados nos processos biológicos “resposta ao estresse oxidativo” e “reparo do DNA”, como *UCP3*, *PTGS2*, *ATF3*, *FOSB*, *DUSP1* e *TNFAIP3*, cujos dados de expressão foram confirmados por qRT-PCR. Já a análise de grupos gênicos identificou 49 e 55 grupos gênicos significativamente expressos e enriquecidos em pacientes DM1, respectivamente, destacando-se vias relacionadas à sinalização apoptótica, resposta ao hidróperóxido, reparo do DNA por recombinação homóloga e resposta ao estresse do retículo endoplasmático. Quanto aos dados de expressão proteica (*western*

blotting), PTGS2 e ATF3 não apresentaram níveis de expressão detectáveis em nenhum dos dois grupos estudados, enquanto que para DUSP1 não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, apesar de os três genes se apresentarem induzidos em pacientes DM1. Os resultados do ensaio do gene repórter da luciferase demonstraram a ocorrência da interação entre hsa-miR-148a e *DUSP1* em meio celular. Essa evidência aliada aos dados de *western blotting*, sugerem a possibilidade de hsa-miR-148a atuar na repressão traducional de *DUSP1*. Em conjunto, os resultados do presente estudo indicaram perfis distintos de expressão de microRNAs e mRNAs em PBMCs de pacientes DM1 comparados a indivíduos saudáveis, sendo que adicionalmente, dados inéditos relacionados à interação microRNAs-mRNAs em DM1 foram obtidos, principalmente associados à resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA, sugerindo um distúrbio na rede microRNA-alvo em pacientes DM1.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus tipo 1. Perfis de expressão gênica. MicroRNAs. Resposta ao estresse oxidativo. Reparo do DNA.

ABSTRACT

TAKAHASHI, P. **Gene expression profiles and possible interactions between microRNAs and mRNAs in type 1 Diabetes Mellitus, focusing on response to oxidative stress and DNA repair.** 2014, 215f, Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) results from an autoimmune attack against the pancreatic β cells, ceasing insulin production, which causes hyperglycemia. Although associations between oxidative stress, which can cause DNA damage, and T1DM have been demonstrated, only a few studies have reported differential expression of genes associated with response to oxidative stress and DNA repair in T1DM patients. Moreover, microRNAs (post-transcriptional regulators of gene expression) are implicated in many biological processes and pathological conditions; however, only scarce information is available in the literature concerning the expression of microRNAs in T1DM. In order to better understand the regulatory pathways involved in biological processes that are relevant to T1DM, we aimed to investigate the microRNA and mRNA transcriptional expression profiles by microarray analysis (as well as expression of selected proteins) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from T1DM patients (n=19) compared with healthy non-diabetic individuals (n=11), emphasizing genes related to response to oxidative stress and DNA repair. Microarray expression results indicated 44 differentially expressed microRNAs (35 up- and nine down-regulated) in T1DM patients, with those microRNAs possessing a discriminatory power to clearly stratify the patients from the controls, including hsa-miR-101, hsa-miR148a, hsa-miR-27b, and hsa-miR-424, whose expression data were confirmed by qRT-PCR. Functional annotation analysis performed on the predicted targets of the differentially expressed microRNAs pointed 22 and 12 annotated KEGG pathways for the overexpressed and repressed microRNAs, respectively, many of them related to cancer. Regarding mRNA microarray results, we detected 277 differentially expressed genes in T1DM patients, with 52% of them being potential targets of the differentially expressed microRNAs in T1DM patients. Among these targets, we identified candidate genes for T1DM as well as genes involved in the biological processes “response to oxidative stress” and “DNA repair”, such as *UCP3*, *PTGS2*, *ATF3*, *FOSB*, *DUSP1* and *TNFAIP3*, whose expression data were confirmed by qRT-PCR. Furthermore, out of the 49 and 55 significantly expressed/enriched gene sets in T1DM patients, respectively, five pathways related to apoptotic signaling, response to hydroperoxide, DNA repair via homologous recombination, and response to endoplasmic reticulum stress were of interest for the present work. Concerning protein expression results (*western blotting*), *PTGS2* and *ATF3* expression was not detected for either the patient or the control group, while significant difference in *DUSP1* expression was not observed between the two groups, although the corresponding mRNAs of those genes were found induced.

Regarding the luciferase assay, our results demonstrated that the interaction between hsa-miR-148a and DUSP1 occurs in the cellular milieu. Therefore, these findings together with those *western blotting* results suggest that hsa-miR-148a could play a role in DUSP1 translational repression. Altogether, our results indicate distinctive microRNA and mRNA expression profiles in PBMCs from T1DM patients relative to healthy non-diabetic individuals. Furthermore, we have provided novel data regarding microRNA-mRNA interactions in T1DM, in particular involving genes associated with response to oxidative stress and DNA repair, suggesting a perturbation in the microRNA-target network in T1DM patients.

Keywords: Type 1 Diabetes Mellitus. Gene expression profiles. MicroRNAs. Response to oxidative stress. DNA repair.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Modelo remitante-recorrente para o desenvolvimento do DM1. A combinação de fatores genéticos e ambientais resulta em uma série de eventos, incluindo a liberação de antígenos das células β , proliferação e ativação das células T CD8⁺ e morte das células β . A linha laranja representa a massa ou função das células β ; as colunas representam as fases do processo imunológico; as fileiras representam os sítios anatômicos onde ocorre cada fase imunológica. Adaptado de van Belle et al. (2011)..... **34**
- Figura 2.** Biogênese dos microRNAs. Os pri-microRNAs são transcritos e processados no núcleo em pre-microRNAs (via canônica) ou os pre-microRNAs são derivados de *splicing* (via mirtrônica). Os pre-microRNAs são então exportados para o citoplasma, onde são clivados em um duplex de microRNA, sendo uma das fitas incorporada ao complexo miRISC para guiar esse complexo proteico a sequências específicas localizadas em mRNAs-alvos (vias canônica e mirtrônica). Adaptado de Filipowicz et al. (2008).... **44**
- Figura 3.** Padrão de expressão e dendograma das 57 sondas diferencialmente expressas ($p < 0,01$, PFP $< 0,05$) que apresentaram valor de AUC $\geq 0,90$ (correspondentes a 44 microRNAs únicos) em PBMCs de pacientes DM1 quando comparados ao grupo controle. Os microRNAs foram agrupados utilizando a distância de Pearson não centralizada com ligação média. Cada coluna representa uma amostra e cada linha representa um microRNA. Os níveis de expressão dos microRNAs induzidos estão representados em vermelho e os níveis de expressão dos reprimidos encontram-se em verde, sendo que maiores intensidades de cor indicam diferenças de expressão maiores. Ausência de diferença nos níveis de expressão está representada em preto. PFP, porcentagem de falsos-positivos; AUC, área sob a curva (Takahashi et al. 2014)..... **87**
- Figura 4.** Vias apontadas pela análise funcional como enriquecidas considerando os potenciais alvos dos microRNAs diferencialmente expressos (que apresentaram valores de AUC $\geq 0,90$), induzidos (**A**) e reprimidos (**B**) em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle. Os escores de enriquecimento obtidos pelo banco de dados DAVID correspondentes a cada via KEGG estão apresentados como os valores de p em escala logarítmica ($-\log$) (Takahashi et al. 2014)..... **90**
- Figura 5.** Expressão relativa dos microRNAs, avaliada por qRT-PCR, cujos alvos preditos estão associados aos processos de resposta ao

estresse oxidativo e reparo do DNA em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle. Para todos os microRNAs, o ensaio foi realizado para 11 amostras de pacientes DM1 e para nove amostras de indivíduos saudáveis não diabéticos, sendo tais amostras as mesmas utilizadas para o método de microarranjos de microRNAs. Os valores de expressão dos microRNAs de interesse foram normalizados com os valores de expressão do gene endógeno RNU48. Para o microRNA hsa-miR-101 (A) utilizou-se o teste T não pareado com correção de Welch, sendo que para os microRNAs hsa-miR-148a (B), hsa-miR-27b (C) e hsa-miR-424 (D) o teste T não pareado foi utilizado. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão. ** indica valores estatisticamente significativos para $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ .....

99

Figura 6. Comparação dos valores de *fold change* (grupo de pacientes DM1 versus grupo controle), obtidos pelos métodos de microarranjos e qRT-PCR, para os microRNAs diferencialmente expressos selecionados. As mesmas amostras (11 pacientes DM1 e nove controles) foram utilizadas para ambos os métodos.....

100

Figura 7. Expressão relativa de genes associados aos processos de resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle avaliada por qRT-PCR. Para todos os genes, o ensaio foi realizado para as 19 amostras de pacientes DM1, sendo que para os genes *UCP3* (A), *PTGS2* (B), *ATF3* (C), *DUSP1* (E) e *TNFAIP3* (F), o ensaio foi realizado para 10 amostras de indivíduos saudáveis não diabéticos (exceto Co_11) e para o gene *FOSB* (D), dois controles foram excluídos (Co_01 e Co_11). Essas amostras foram as mesmas utilizadas para o método de microarranjos. Os valores de expressão dos genes de interesse foram normalizados com os valores de expressão dos dois genes endógenos *GAPDH* e *HPRT1*. Para o gene *TNFAIP3* (F) o teste T não pareado com correção de Welch foi utilizado e as barras representam a média $\pm$ desvio padrão. Para os genes *UCP3* (A), *PTGS2* (B), *ATF3* (C), *FOSB* (D) e *DUSP1* (E), o teste Mann-Whitney foi utilizado e as barras representam a mediana e o intervalo interquartil. * indica valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns, não significativo.....

101

Figura 8. Comparação dos valores de *fold change* (grupo de pacientes DM1 versus grupo controle), obtidos pelos métodos de microarranjos e qRT-PCR, para os genes diferencialmente expressos selecionados.....

102

Figura 9. Expressão proteica avaliada por *western blotting* em PBMCs de pacientes DM1 e indivíduos saudáveis não diabéticos. A análise foi realizada utilizando anticorpos para as seguintes proteínas: PTGS2

(~72 kDa) (**A**), ATF3 (~21/35 kDa) (**B**) e DUSP1 (~40 kDa) (**C**). Para DUSP1, as bandas foram quantificadas e análise estatística realizada (**D**). Os anticorpos para as proteínas β -actina (~42 kDa) e β -tubulina (~55 kDa) foram utilizados como controles endógenos. Extratos das linhagens celulares humanas HeLa e U87 foram usados como controles positivos (C+): para PTGS2 foi utilizada U87; para DUSP1, HeLa; para ATF3 ambas as linhagens (U87 na primeira coluna e HeLa na segunda).....

103

Figura 10. Interações microRNA-mRNA mais favoráveis preditas pela ferramenta RNAhybrid. A sequência superior corresponde ao sítio de ligação do microRNA presente na região 3' UTR do mRNA de *DUSP1* (**A**) ou *PTGS2* (**B**); a sequência inferior corresponde ao microRNA complementar hsa-miR-148a. mfe, energia livre mínima de ligação.....

104

Figura 11. Avaliação das interações preditas hsa-miR-148a/*DUSP1* e hsa-miR-148a/*PTGS2* em meio celular por meio do ensaio do gene repórter luciferase. As construções pmirGLO-*DUSP1*(wt) ou pmirGLO-*DUSP1*(mut) (**A**), bem como pmirGLO-*PTGS2*(wt) ou pmirGLO-*PTGS2*(mut) (**B**), foram co-transfectadas com o mímico de interesse (hsa-miR-148a – MIMAT0000243) em células HEK293T. A atividade da luciferase de vagalume foi normalizada com a da luciferase de *Renilla*, sendo ambas avaliadas 36 horas após a transfecção. O teste T pareado foi utilizado e as barras representam a média $\pm$ desvio padrão. wt, sequência selvagem; mut, sequência mutada; * valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$; ns, não significativo.....

105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais características clínicas dos pacientes DM1.....	56
Tabela 2.	Principais características dos indivíduos sadios não diabéticos (controles).....	57
Tabela 3 -	MicroRNAs diferencialmente expressos que apresentaram valores de AUC $\geq 0,90$ em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle (Takahashi et al. 2014).....	85
Tabela 4.	MicroRNAs diferencialmente expressos com valores de AUC $\geq 0,90$ em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle (presente trabalho) encontrados diferencialmente expressos em duas linhagens humanas tumorais em relação a PBMCs normais (Vaz et al. 2010) e a regulação dos mesmos em cada trabalho.....	92
Tabela 5.	Lista de genes diferencialmente expressos em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle, os quais já foram amplamente relacionados ao DM1 na literatura.....	94
Tabela 6.	Genes diferencialmente expressos em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle (com os respectivos valores de <i>fold change</i>) que apresentaram maior similaridade com genes pertencentes aos termos GO “resposta ao estresse oxidativo” e “reparo do DNA” segundo a análise pela ferramenta Endeavour.....	95
Tabela 7.	Processos biológicos de interesse observados como diferencialmente expressos/enriquecidos em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle.....	96
Tabela 8.	Interações microRNA-mRNA diferencialmente expressos em PBMCs de pacientes DM1 comparados aos controles.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

8-OHdG: 8-hidroxideoxiguanosina
8-oxoG: 8-oxo-Guanina
ADA: American diabetes association
ADM: adrenomedullin
AGE: advanced glycation end-products
AGO: proteína Argonauta
APC: antigen presenting cell
ARE: antioxidant response elements
ATF/CREB: Activating Transcription Factor/cAMP Responsive Element Binding Protein
ATF3: activating transcription factor 3
AUC: area under the curve
BCL2A1: BCL2-related protein A1
BER: base-excision repair
BIP: immunoglobulin heavy chain
BSA: albumina bovina
CAT: catalase
CCL3L3: chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3
CCL2: chemokine (C-C motif) ligand 2
CCL4: chemokine (C-C motif) ligand 4
CCL20: chemokine (C-C motif) ligand 20
CCR2: chemokine (C-C motif) receptor 2
CD69: CD69 molecule
CDKN1C: cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)
CES1: carboxylesterase 1
CG: grupos carbonila
CHOP: C/EBP homologous protein
CLASH: crosslinking, ligation, and sequencing of hybrids
COX-2: Ciclo-oxigenase-2
CTLA4: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL1: chemokine (C-X-C motif) ligand 1
CXCL2: chemokine (C-X-C motif) ligand 2

CXCL3: chemokine (C-X-C motif) ligand 3
CXCL10: chemokine (C-X-C motif) ligand 10
DAVID: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DDIT4: DNA-damage-inducible transcript 4
DDX3Y: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 3, Y-linked
DDX43: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 43
DEPC: dietilpirocarbonato
DGCR8: DiGeorge syndrome critical region gene 8
DM: Diabetes Mellitus
DM1: Diabetes Mellitus tipo-1
DMSO: dimetilsulfóxido
DMTU: dimetiltiourea
DNA: ácido desoxirribonucleico
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DSB: DNA double strand break
DSP: desmoplakin
DTT: Ditiotreitól
DUSP1: dual specificity phosphatase 1
DUSP2: dual specificity phosphatase 2
EASE Score: a modified Fisher Exact P-Value
EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid
ELA: esclerose lateral amiotrófica
EPC: endothelial progenitor cell
ERK: extracellular regulated kinase
EXP5: exportina 5
FAK: focal adhesion kinase
FE: Feature Extraction
FMRP: fragile X mental retardation protein
FOS: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FOSB: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
FPG: fasting plasma glucose
Fpg: formamidopyrimidine DNA glycosylase
FSB: frozen storage buffer

GAD65: glutamic acid decarboxylase 65
GADD45B: growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GnRH: gonadotropin-releasing hormone
GO: gene ontology
GPx: glutathione peroxidase
GSA: gene set analysis
GSEA: gene set enrichment analysis
GSH: glutathione reduced
GTP: guanosine triphosphate
GZMB: granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)
GZMH: granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)
HbA1C: hemoglobin glycosylated
HCFMRP-USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HCRP: Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
HIF1A: hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)
HLA: major histocompatibility complex
HLA-DQB1: major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1
HP: haptoglobin
HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HR: homologous recombination
IAA: auto-antibodies anti-insulin
I-A2: insulinoma-associated antigen-2
IDF: International Diabetes Federation
IFN- α : Interferon-alpha
IFN- γ : Interferon-gamma
IL-1 α : Interleukin-1 alpha
IL-1 β : Interleukin-1 beta
IL-6: interleukin 6
INS: gene of insulin
JUNB: jun B proto-oncogene
Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LPL: lipoprotein lipase

LPO: lipoperóxido

LPS: lipopolissacarídeo

LTF: actotransferrin

MAFF: V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

MAPK8IP1: mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1

MDA: malondialdeído

miRISC: complexo de silenciamento induzido por microRNAs

MMR: mismatch repair

MUTYH: mutY glicosilase homologue

MYC: v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)

MYOM2: myomesin 2

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

NE: norepinefrina

NER: nucleotide-excision repair

NFKBIA: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

NHEJ: non-homologous end joining

NOX: NADPH oxidase

NPH: Neutral Protamine Hagedorn

Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2

NTP: nucleoside triphosphate

PAR-CLIP: Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation

PBMC: peripheral blood mononuclear cell

PBS: tampão fosfato-salino

PCA: principal component of analysis

PCR-SSO: polymerase chain reaction – specific sequence of oligonucleotides

PDGFRB: platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide

PFKFB3: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

PFKL: phosphofructokinase, liver

PFP: percentage of false-positives

PLN: pancreatic lymph nodes
PPP1R15A: protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A
PTGS2: prostaglandin-endoperoxide synthase 2
PTPN22: protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22
PTX3: pentraxin 3, long
qRT-PCR: real-time quantitative polymerase chain reaction
RE: retículo endoplasmático
RIN: RNA integrity number
RNA: ácido ribonucleico
RNP: ribonucleoproteico
ROBO1: roundabout, axon guidance receptor 1
ROC: receiver-operating characteristic
ROS: reactive oxygen species
SDF-1: stromal cell-derived factor-1
SDS: dodecil sulfato de sódio
SLIT2: slit homolog 2 (Drosophila)
SOC: super optimal broth medium
SOD: superóxido dismutase
SSB: DNA single strand break
TE: tampão Tris-EDTA
TGF- β : transforming growth factor beta
TMTU: tetrametiltiurea
TNF: tumor necrosis factor
TNF- α : tumor necrosis factor alpha
TNFAIP3: tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
TP53: tumor protein 53
TR: transcrição reversa
TRA: tissue-restricted antigens
TRBP: TAR RNA-binding protein
Treg: célula T regulatória
UCP3: uncoupling protein 3
UPR: unfolded protein response
UTR: untranslated region
XBP-1: X-box binding protein 1
ZnT8: zinc transporter 8

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	29
1.1. <i>Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1).....</i>	31
1.2. <i>Estresse oxidativo, defesa antioxidante e reparo do DNA.....</i>	36
1.2.1. <i>Estresse oxidativo e danos no DNA em DM1.....</i>	39
1.3. <i>MicroRNAs.....</i>	41
1.3.1. <i>Controle da expressão gênica por microRNAs.....</i>	45
1.4. <i>Expressão de microRNAs e genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA em DM1.....</i>	46
 2. HIPÓTESE.....	 49
 3. OBJETIVOS.....	 51
3.1. <i>Objetivo geral.....</i>	52
3.2. <i>Objetivos específicos.....</i>	52
 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	 54
4.1. <i>Casuística.....</i>	55
4.2. <i>Coleta de sangue e separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).....</i>	57
4.3. <i>Extração de RNA, quantificação e avaliação de sua qualidade.....</i>	58
4.4. <i>Extração do DNA e tipificação dos alelos de histocompatibilidade de classe II.....</i>	59
4.5. <i>Microarranjos de microRNAs.....</i>	59
4.5.1. <i>Amplificação e marcação de microRNAs.....</i>	60
4.5.2. <i>Hibridação das amostras com as lâminas de microarranjos e lavagem das lâminas.....</i>	60
4.6. <i>Microarranjos de mRNAs.....</i>	61
4.6.1. <i>Amplificação e marcação do RNA.....</i>	61
4.6.2. <i>Purificação e quantificação do RNA amplificado e marcado.....</i>	62
4.6.3. <i>Hibridação das amostras com as lâminas de microarranjos e lavagem das lâminas.....</i>	62

4.7. Transcrição reversa (TR) e reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (qRT-PCR) de microRNAs.....	63
4.8. TR e qRT-PCR de mRNAs.....	64
4.9. Extração e quantificação de proteínas.....	65
4.10. Western blotting.....	66
4.11. Ensaio do gene repórter luciferase.....	68
4.11.1. Preparação de células <i>Escherichia coli</i> quimio-competentes.....	68
4.11.2. Seleção e desenho dos oligonucleotídeos.....	69
4.11.3. Digestão e ligação do vetor e oligonucleotídeos.....	69
4.11.4. Transformação do plasmídeo recombinante em <i>E. coli</i> quimio-competentes.....	70
4.11.5. Purificação do plasmídeo recombinante.....	71
4.11.6. Avaliação da luminescência relativa.....	71
5. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	73
5.1. Expressão gênica obtida por microarranjos.....	74
5.1.1. MicroRNAs.....	74
5.1.1.1. Quantificação, correção do background, normalização e remoção das amostras outliers.....	74
5.1.1.2. Análise estatística e geração das curvas de característica de operação do receptor (ROC, do inglês receiver-operating characteristic).....	75
5.1.1.3. Predição dos alvos dos microRNAs e análise de anotação funcional.....	76
5.1.2. mRNAs.....	77
5.1.2.1. Quantificação, correção do background, normalização, ajuste dos dados, remoção das amostras outliers e análise estatística.....	79
5.1.2.2. Análise de grupos gênicos: GSA (do inglês gene set analysis) e GSEA (do inglês gene set enrichment analysis).....	79
5.1.2.3. Priorização gênica.....	79
5.1.3. Interação microRNA-Mrna.....	80
5.2. Expressão de microRNAs e mRNAs por qRT-PCR.....	80

5.3. Expressão proteica por western blotting.....	81
5.4. Ensaio do gene repórter luciferase.....	81
6. RESULTADOS.....	83
6.1. Expressão de microRNAs em pacientes DM1 avaliada pelo método de microarranjos.....	84
6.1.1. Normalização, ajuste dos dados, análise estatística e geração das curvas ROC.....	84
6.1.2. Predição dos alvos e análise de anotação funcional.....	88
6.2. Expressão de mRNAs em pacientes DM1 avaliada pelo método de microarranjos.....	92
6.2.1. Normalização, ajuste dos dados, análise estatística e priorização gênica.....	92
6.2.2. Análise de grupos gênicos (GSA e GSEA)	96
6.3. Comparação dos resultados de expressão de microRNAs e mRNAs	96
6.4. Expressão de microRNAs avaliada por qRT-PCR.....	98
6.5. Expressão de mRNAs avaliada por qRT-PCR.....	100
6.6. Expressão das proteínas PTGS2, ATF3 e DUSP1 avaliada por western blotting.....	102
6.7. Interações microRNA-alvo avaliadas pelo ensaio do gene repórter luciferase.....	104
7. DISCUSSÃO.....	106
7.1. Perfis de expressão de microRNAs em pacientes DM1.....	107
7.2. Perfis de expressão de mRNAs em pacientes DM1.....	112
7.3. Interações microRNA-Mrna.....	122
8. CONCLUSÕES.....	126
REFERÊNCIAS.....	128
ANEXOS.....	154
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos pacientes	

DM1.....	155
ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos indivíduos sadios não diabéticos (controles)	157
ANEXO C - Aprovação do presente estudo pelo Comitê de Ética do HCFMRP-USP	159
ANEXO D e ANEXO E - <i>Boxplots</i> dos resultados obtidos nos experimentos de microarranjos de microRNAs de todos os indivíduos estudados (pacientes DM1 e controles) antes da normalização (D) e após a normalização pelo método quantile (E). A parte superior de cada retângulo cinza representa o percentile 75, a parte inferior o percentile 25 e a metade representa o percentile 50 (mediana); as extremidades das barras representam o mínimo e o máximo de todos os dados de expressão; os círculos pretos representam os valores de intensidade de sinal de sondas acima do percentile 75 e abaixo do percentile 25; a escala corresponde aos valores de intensidade dos dados de expressão.....	160
ANEXO F - Vias KEGG significativamente enriquecidas em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle e os microRNAs diferencialmente expressos com valores de $AUC \geq 0,90$ que potencialmente as regulam (Takahashi et al. 2014).....	161
ANEXO G e ANEXO H - <i>Boxplots</i> dos resultados obtidos nos experimentos de microarranjos de mRNAs de todos os indivíduos estudados (pacientes DM1 e controles) antes da normalização (A) e após a normalização pelo método quantile (B). A parte superior de cada retângulo cinza representa o percentile 75, a parte inferior o percentile 25 e a linha no meio representa o percentile 50 (mediana); as extremidades das barras representam o mínimo e o máximo de todos os dados de expressão; os círculos pretos representam os valores de intensidade de sinal de sondas acima do percentile 75; a escala corresponde aos valores de intensidade dos dados de expressão.....	165
ANEXO I - Gráfico da PCA exibindo a distribuição espacial dos pacientes DM1 (alaranjado) e dos indivíduos controles (vermelho) referente aos dados normalizados de mRNA após terem sido ajustados pelo método Bayes empírico (método de microarranjos).....	166

ANEXO J - Genes diferencialmente expressos em PBMCs de pacientes DM1 comparados ao grupo controle obtidos nos experimentos de microarranjos de mRNAs. PFP, porcentagem de falsos-positivos.....	167
ANEXO K - Processos biológicos diferencialmente expressos/enriquecidos em PBMCs de pacientes DM1 comparados ao grupo controle obtidos por meio do <i>BRB-ArrayTools</i> . CC, componente celular; PB, processo biológico; FM, função molecular. Os processos biológicos de interesse selecionados encontram-se destacados em negrito.....	174
ANEXO L - Genes diferencialmente expressos e os microRNAs diferencialmente expressos, com valores de AUC $\geq 0,90$, (em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle) que potencialmente os regulam (resultados obtidos pela técnica de microarranjos de mRNAs e microRNAs, respectivamente).....	178
ANEXO M - Expressão relativa dos microRNAs, avaliada por qRT-PCR, cujos alvos preditos estão associados aos processos de resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle. Para todos os microRNAs, o ensaio foi realizado para 19 amostras de pacientes DM1 e para 11 amostras de indivíduos sadios não diabéticos, sendo tais amostras as mesmas utilizadas para o método de microarranjos de mRNAs. Os valores de expressão dos microRNAs de interesse foram normalizados com os valores de expressão do gene endógeno RNU48. Para o microRNA hsa-miR-101 (A) utilizou-se o teste T não pareado com correção de Welch, sendo que para os microRNAs hsa-miR-148a (B) e hsa-miR-424 (D), o teste T não pareado foi utilizado, sendo que as barras representam a média $\pm$ desvio padrão. Para o microRNA hsa-miR-27b (C) foi aplicado o teste Mann-Whitney e as barras representam a mediana e o intervalo interquartil. *** indica valores estatisticamente significativos para $p < 0,001$	184
ANEXO N - Comparação dos valores de <i>fold change</i> (grupo de pacientes DM1 <i>versus</i> grupo controle), obtidos pelos métodos de microarranjos e qRT-PCR, para os microRNAs diferencialmente expressos selecionados. As mesmas amostras (19 pacientes DM1 e 11 controles) foram utilizadas	

para ambos os métodos.....	185
ANEXO O - Lista da produção bibliográfica.....	186
ANEXO P - Artigo publicado.....	188
ANEXO Q - Capítulo de livro.....	199

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas, resultante da deficiência da secreção da insulina, ação da mesma, ou ambas, consequentemente dando origem à hiperglicemia (ADA 2013). Dentre os sintomas da hiperglicemia acentuada destacam-se perda de peso, visão turva, polidipsia, poliúria, polifagia, assim como suscetibilidade a determinadas infecções e comprometimento do crescimento. Ainda, hiperglicemia com cetoacidose ou síndrome hiperosmolar não cetótica podem ser consequências do diabetes não controlado. Com a progressão da doença ao longo dos anos, uma série de complicações pode ocorrer, como por exemplo, neuropatia autonômica e periférica, nefropatia e retinopatia (ADA 2013).

Os seguintes critérios têm sido utilizados para o diagnóstico do DM: níveis de glicose plasmática em jejum (FPG, do inglês *fasting plasma glucose*) ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L); níveis de glicose plasmática duas horas após uma carga de 75 g de glicose ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L); porcentagem de hemoglobina glicada (HbA1C) $\geq 6,5\%$ (ADA 2013), um parâmetro que corresponde aos valores médios de glicose das oito a 12 semanas precedentes (Nathan et al. 2007). Na ausência de hiperglicemia inequívoca, esses três critérios devem ser confirmados pela repetição dos testes. No caso de indivíduos que apresentam sintomas hiperglicêmicos clássicos ou crise hiperglicêmica, os níveis de glicose plasmática casual devem ser ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) (ADA 2013).

O DM representa um problema de saúde pública relevante. De acordo com a Federação Internacional do Diabetes (IDF, do inglês *International Diabetes Federation*), havia aproximadamente 382 milhões de pessoas diabéticas entre 20 e 79 anos em todo o mundo em 2013, sendo que o Brasil ocupou a quarta posição dentre os países/territórios com o maior número de diabéticos (11,9 milhões), atrás apenas da China (98,4 milhões), Índia (65,1 milhões) e Estados Unidos da América (24,4 milhões) (<http://www.idf.org/diabetesatlas>) (IDF 2013).

Uma das principais categorias do DM é o Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1), resultante de um ataque autoimune e específico contra as células β localizadas nas ilhotas de Langerhans do pâncreas, sendo que essas células são as únicas responsáveis por produzir insulina (Onengut-Gumuscu e Concannon 2006; van Belle et al. 2011; ADA 2013). Consequentemente, esse ataque causa a destruição das

células β ou danos suficientes para diminuir e eventualmente suprimir a produção de insulina (van Belle et al. 2011). Para o tratamento desse tipo de diabetes, além de injeções de insulina exógena, as quais têm sido utilizadas desde aproximadamente 1920 (van Belle et al. 2011), é importante ressaltar a necessidade de uma boa auto-gestão do DM1, incluindo não somente o tratamento com esse hormônio, mas também o monitoramento dos níveis de glicose no sangue, dieta saudável e atividade física (IDF 2013). Os pacientes DM1 representam cerca de 5-10% dos diabéticos e, apesar de ocorrer em qualquer idade, essa forma de diabetes geralmente surge na infância e adolescência (ADA 2013). Estima-se que em todo o mundo mais de 79.000 crianças (com menos de 15 anos de idade) desenvolvam DM1 anualmente (IDF 2013), sendo que em vários países a incidência desse tipo de diabetes em crianças está aumentando cerca de 3% ao ano (DIAMOND Project Group 2006; Patterson et al. 2009; IDF 2013).

1.1. Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1)

O DM1 apresenta duas fases distintas. A primeira é a insulite, que é definida como uma reação inflamatória caracterizada pela invasão das ilhotas pancreáticas por células do sistema imune (Mathis et al. 2001; Cnop et al. 2005; Willcox et al. 2009). Dentre as células invasoras incluem-se as células T $CD8^+$ (que estão presentes em maior quantidade), os macrófagos $CD68^+$, as células T $CD4^+$ e, ainda, as células B $CD20^+$ (Willcox et al. 2009). Juntamente com esta resposta celular, inicia-se uma resposta humoral que inclui a produção de autoanticorpos contra uma variedade de antígenos das células β (Eisenbarth 1986; Eizirik et al. 2009; In't Veld 2011). Os principais autoanticorpos são reativos a quatro autoantígenos das ilhotas: insulina (micro IAA ou mIAA), GAD65 (do inglês *glutamic acid decarboxylase 65*), I-A2/ICA512 (do inglês *insulinoma-associated antigen-2*) e ZnT8 (do inglês *zinc transporter 8*) (Wenzlau et al. 2007; van Belle et al. 2011).

A segunda fase do DM1 é o diabetes propriamente dito, decorrente da aniquilação da maior parte das células β , o que resulta em hiperglicemia devido à produção insuficiente de insulina para controlar os níveis de glicose no sangue (Mathis et al. 2001). A perda dessas células pode passar despercebida por muitos

anos, sendo que os primeiros sintomas clínicos se tornam aparentes apenas após grande parte das células β tenha sido morta ou se tornado incapaz de exercer sua função (van Belle et al. 2011). Existem controvérsias em relação à quantidade de células β eliminadas no momento do diagnóstico do DM1. Foi relatado que o DM1 é clinicamente aparente somente quando cerca de 90% da massa das células β já foi destruída, apesar de ainda haver uma porcentagem de massa funcional (Tanaka et al. 2004; Meier et al. 2006; Kaizer et al. 2007; Wang et al. 2008b). Por outro lado, foi também sugerido que a destruição das células β no momento do diagnóstico pode ser dependente da idade, podendo ocorrer de forma pouco acentuada em vários pacientes. Estima-se que a diminuição de 40% da massa das células β foi suficiente para que os sintomas clínicos em indivíduos com 20 anos de idade se tornassem evidentes (Klinke 2008; Pugliese 2012).

O DM1 é uma doença complexa que resulta da influência conjunta de genes de suscetibilidade e ação de fatores ambientais, levando à redução e eventualmente cessação da síntese de insulina (Atkinson e Eisenbarth 2001; van Belle et al. 2011; ADA 2013). Mais de 70 genes candidatos associados à doença já foram descritos de acordo com o banco de dados T1Dbase (última atualização em 15 de outubro de 2013

— <http://www.t1dbase.org/page/Regions/display/species/human/disease/1/type/assoc>) (Burren et al. 2011). Os alelos do complexo de antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *human leukocyte antigen complex*), localizados na região cromossômica 6p21, são os fatores genéticos que conferem maior suscetibilidade ao DM1, proporcionando 50-60% do risco total conferido por alelos herdados (Noble e Erlich 2012; Pugliese 2012); dentre eles, os alelos *HLA* de classe II *DQB1* *0201, *DQB1* *0302, *DRB1* *03 e *DRB1* *04 estão associados à suscetibilidade ao DM1 em brasileiros da região sudeste do país (Alves et al. 2006).

No que diz respeito aos outros fatores genéticos que também contribuem para a suscetibilidade à doença, estão incluídos os genes *INS* (insulina) na região cromossômica 11p15, *PTPN22* (do inglês *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) na 1p13, *CTLA4* (do inglês *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) na 2q33, *IL2RA* (do inglês *interleukin 2 receptor alpha*) na 10p15, dentre outros (Bell et al. 1984; Nistico et al. 1996; Bottini et al. 2004; Lowe et al. 2007; Barrett et al. 2009; Burren et al. 2011). Em relação aos fatores ambientais desencadeantes, a busca pelos mesmos tem sido intensa, havendo até o presente

somente evidências indiretas (e muitas vezes contraditórias) relacionadas a infecções virais (incluindo enterovírus e rotavírus), agentes bacterianos, drogas, toxinas, estresse, ingestão de proteínas do leite de vaca (principalmente albumina) e proteínas do trigo (principalmente glúten), bem como deficiência de vitamina D (van Belle et al. 2011; Gan et al. 2012).

Com o objetivo de transmitir auto-tolerância imunológica no início da vida, antígenos restritos a tecidos (TRAs, do inglês *tissue-restricted antigens*) ou periféricos de vários órgãos são sintetizados ectopicamente no timo (Derbinski e Kyewski 2010; Pugliese 2012). Apesar dessa expressão no timo, inúmeros TRAs se tornam autoantígenos em doenças autoimunes devido a mecanismos genéticos (*splicing* alternativo, variação alélica, regulação epigenética da expressão gênica), os quais podem afetar quantitativa e qualitativamente tal expressão (Pugliese et al. 1997; Vafiadis et al. 1997; Diez et al. 2001; Dogra et al. 2006; Pugliese 2012). Há evidências de que a quantidade e a qualidade da expressão de autoantígenos no timo afetam a seleção positiva de células T reguladoras (Tregs) e/ou a seleção negativa de células T autorreativas, podendo acarretar a maturação de um sistema imune com maior suscetibilidade a gerar respostas autoimunes (Durinovic-Bello et al. 2010; Pugliese 2012). A autoimunidade no DM1 é específica às células β pancreáticas, sendo que dentre as teorias existentes para explicar a indução dessa autoimunidade encontram-se: expressão anormal dos genes *HLA*, mimetismo molecular, deficiência na tolerância central e periférica, dentre outras (Haller et al. 2005).

Embora a etiologia do DM1 não tenha sido completamente esclarecida, van Belle et al. (2011) propuseram um modelo remitente-recorrente para o desenvolvimento do DM1, no qual um desequilíbrio entre as Tregs e as células T efetoras autorreativas poderia ocorrer ao longo do tempo e eventualmente resultar na redução da massa das células β (**Figura 1**).

Figura 1. Modelo remittente-recorrente para o desenvolvimento do DM1. A combinação de fatores genéticos e ambientais resulta em uma série de eventos, incluindo a liberação de antígenos das células β, proliferação e ativação das células T CD8⁺ e morte das células β. A linha laranja representa a massa ou função das células β; as colunas representam as fases do processo imunológico; as fileiras representam os sítios anatómicos onde ocorre cada fase imunológica. Adaptado de van Belle et al. (2011).

Segundo esse modelo, em indivíduos que apresentam predisposição genética, um fator ambiental desencadeante levaria ao surgimento da doença por meio de eventos no pâncreas e na periferia (circulação). No pâncreas, interferon (IFN)-α e posteriormente HLA de classe I são induzidos nas células β, o que faz com que estas fiquem expostas ao ataque por células T CD8⁺ efetoras, as quais possuem especificidade para antígenos pancreáticos; deste modo, os antígenos das células β são liberados, capturados por células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *antigen presenting cells*) e transportados para os nódulos linfáticos pancreáticos (NLPs). Já na periferia, o fator ambiental gera um ambiente pró-

inflamatório que reprime a ação das Tregs. Quando apresentados neste ambiente pró-inflamatório, com o auxílio das células T CD4⁺, os antígenos das células β iniciam a conversão de células B em plasmáticas, as quais produzem autoanticorpos contra insulina (soroconversão). Ainda, ocorre a proliferação das células T CD8⁺ autorreativas e a migração das mesmas para o pâncreas, acarretando a morte das células β por meio de perforina, IFN- γ e TNF- α (do inglês *tumor necrosis factor alpha*). Esse segundo evento de morte celular resulta em pseudoatrofia (algumas células β suprimem a síntese de insulina), bem como leva à disseminação de epítomos, por induzir a liberação de antígenos adicionais das células β , os quais são capturados por APCs (incluindo células B, as quais podem apresentá-los às células T CD4⁺ e CD8⁺) e transportados para os NLPs (van Belle et al. 2011).

O terceiro evento de morte celular é mais acentuado e normalmente resulta em diminuição considerável tanto da função quanto da massa das células β . Por outro lado, esse processo de inflamação autoimune também pode induzir proliferação das células β , acarretando um aumento temporário da massa dessas células. Essa fase de remissão (fase *honeymoon*) após o diagnóstico da doença é uma fase temporária durante a qual a síntese de insulina é relativamente auto-suficiente (Baker et al. 1967; van Belle et al. 2011). Ainda, ocasionalmente, as Tregs também têm a capacidade de amenizar a resposta efetora. Esse contraste entre as respostas autorreativas e a proliferação das células β juntamente com a ação das Tregs gera possivelmente um perfil remitente-recorrente. Porém, eventualmente, as respostas autorreativas se sobrepõem, resultando no DM1 (van Belle et al. 2011) (**Figura 1**).

As células T são consideradas as executoras finais da aniquilação das células β (van Belle et al. 2011). No caso das células CD8⁺, os antígenos são peptídeos apresentados por moléculas HLA de classe I, que são encontradas em praticamente todos os tipos celulares. No que diz respeito às células CD4⁺, os antígenos são peptídeos apresentados pelas moléculas HLA de classe II, que estão presentes principalmente em APCs (Mathis et al. 2001). Um dos mecanismos de eliminação das células β mediada pelas células CD8⁺ envolve a liberação de grânulos citolíticos (contendo perforina e a serina-protease citotóxica granzima) por essas células por exocitose após contato direto com as células-alvo (Podack et al. 1988; van Belle et al. 2011; Padgett et al. 2013). Ao serem liberadas, as perforinas geram orifícios na membrana plasmática das células das ilhotas, permitindo a

entrada de granzimas, as quais induzem morte celular por apoptose ou necrose (Podack et al. 1988; Padgett et al. 2013).

O outro mecanismo de destruição das células β mediada pelas células $CD8^+$ envolve interações entre ligantes Fas (FasL, induzidas por células $CD8^+$ após contato direto com células β) e receptor Fas, o qual está implicado em indução de apoptose e é expresso por células β (Savinov et al. 2003; van Belle et al. 2011; Padgett et al. 2013). Quanto às células $CD4^+$, estas não induzem a morte das células β por meio de contato direto, mas produzem citocinas pró-inflamatórias, como $TNF-\alpha$ e $INF-\gamma$, as quais ativam macrófagos ou outras células acessórias para a aniquilação das células β (Padgett et al. 2013).

1.2. Estresse oxidativo, defesa antioxidante e reparo do DNA

Espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) são moléculas pequenas e reativas que contêm um átomo de oxigênio em sua estrutura (Lenzen 2008; Martinon 2010; Halliwell e Gutteridge 2007). A reatividade das ROS é variável e existe uma grande diversidade dessas moléculas, as quais podem ser classificadas em radicais livres quando contêm um elétron não pareado, tais como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) (a ROS mais reativa); espécies não radicalares, incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2); ânions, como por exemplo superóxido (O_2^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$); e, por fim, não íons, tais como peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (Lenzen 2008; Martinon 2010).

As ROS podem ser formadas tanto de forma exógena quanto endógena. Dentre as fontes exógenas destacam-se o cigarro, poluentes do ar, diversas drogas e também intensas formas de energia como radiação ultravioleta e ionizante. Por sua vez, as ROS podem ser geradas a partir de várias fontes endógenas em condições normais do metabolismo do oxigênio, provenientes principalmente de reações na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, podendo também ser produzidas por NADPH oxidases (NOXs), enzimas do citocromo P450, sintases do óxido nítrico, xantina oxidase, ciclooxigenases, lipoxigenases, dentre outros (Valko et al. 2004; Martinon 2010; Jiang et al. 2011; Nathan e Cunningham-Bussel 2013).

Em condições normais, as ROS atuam em vários alvos de forma específica e afetam consideravelmente a função celular (Nathan e Cunningham-Bussell 2013), estando envolvidas em processos fisiológicos, incluindo angiogênese, controle do crescimento, diferenciação e migração celular, além de respostas inflamatórias/imunes (Martinon 2010). Por outro lado, quando em excesso, as ROS podem ser prejudiciais às células. Para manter os níveis fisiológicos de ROS em equilíbrio, existe um sistema de defesa antioxidante que é composto por mecanismos não-enzimáticos, enzimáticos e adaptativo, o último levando à indução da expressão de genes antioxidantes (Kalyanaraman 2013). No que diz respeito aos mecanismos não-enzimáticos, dentre os antioxidantes que apresentam peso molecular pequeno encontram-se o α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno, glutathiona reduzida (GSH), dentre outros. A vitamina E pode abolir a peroxidação lipídica. A vitamina C, por sua vez, reage rapidamente com inúmeras ROS, tais como superóxido e radical hidroxila (Kalyanaraman 2013).

Em relação aos mecanismos enzimáticos, existem ao menos três tipos de enzimas superóxido dismutase (SOD): SOD extracelular, SOD citosólica (cobre/zinco) e SOD mitocondrial (manganês), as quais estão implicadas na dismutação normal do superóxido (Kalyanaraman 2013). As enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) estão envolvidas na decomposição do peróxido de hidrogênio, sendo que a primeira atua principalmente quando o peróxido de hidrogênio está presente em baixas concentrações e a última em resposta a altos níveis (Kalyanaraman 2013). Por fim, a exposição constante a concentrações moderadas de oxidantes tem como consequência a produção elevada de enzimas antioxidantes por meio do mecanismo adaptativo, levando ao restabelecimento da homeostase celular. Esse mecanismo é composto por Keap1 (do inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*), Nrf2 (do inglês *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) e elementos de resposta antioxidante (ARE, do inglês *antioxidant response elements*). Em condições normais, a proteína Nrf2 é estabilizada no citoplasma por meio de sua associação com a proteína Keap1. Entretanto, em resposta a níveis elevados de ROS, Keap1 e Nrf2 se desassociam e a última é transportada ao núcleo, onde se liga a sequências de DNA presentes em ARE, resultando assim, na indução da transcrição de genes como SOD, CAT e GPx (Kalyanaraman 2013).

Apesar da existência desses três mecanismos de defesa antioxidante, ainda pode ocorrer diminuição das concentrações de moléculas ou enzimas antioxidantes,

comprometimento do mecanismo adaptativo, ou mesmo uma maior geração de ROS. Esses eventos acabam por dar origem ao estresse oxidativo, que é um desequilíbrio entre os níveis de pró-oxidantes e os de antioxidantes, favorecendo os primeiros (Kalyanaraman 2013). O estresse oxidativo causa consequências deletérias para o organismo e assim, tem sido relacionado a um grande número de processos patológicos, dentre eles se destacam isquemia, arteriosclerose, hipertensão, câncer, envelhecimento, doenças neurodegenerativas e também o próprio diabetes (Droge 2002; Martinon 2010). Tais implicações são esperadas já que quando em excesso, as ROS podem causar danos a lipídeos, proteínas, carboidratos e ao DNA (Kalyanaraman 2013; Storr et al. 2013), resultando em quebras de fita simples e de fita dupla do DNA (SSB, do inglês *single strand breaks* e DSB, do inglês *double strand breaks*, respectivamente), danos às moléculas de açúcar do DNA, ligações cruzadas intracadeia e intercadeia e entre o DNA e proteínas e várias modificações de base (Dizdaroglu 2012; Storr et al. 2013). Um dos produtos do dano oxidativo ao DNA é a 8-oxo-Guanina (8-oxoG), um dos mais abundantes e melhor caracterizados, que pode atuar como uma fonte direta de mutações envolvendo transversões de C:G para A:T quando presente no genoma durante a replicação do DNA (van Loon et al. 2010).

Em contrapartida, existem vários mecanismos envolvidos no reparo de danos oxidativos no DNA, cuja função é proteger as células dessas lesões, as quais podem originar mutações, deste modo, podendo interferir na manutenção da estabilidade genômica. Esses mecanismos de reparo atuam na remoção das lesões oxidativas e na restauração da estrutura do DNA (Dizdaroglu 2012; Storr et al. 2013). Os principais são o reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês *nucleotide-excision repair*) e o reparo por excisão de bases (BER, do inglês *base-excision repair*) (Dizdaroglu 2012; Friedberg et al. 2006). O primeiro reconhece lesões que distorcem a dupla hélice e sua função é remover a região lesionada responsável por tal efeito (da Costa e Menck 2004). O segundo, por sua vez, consiste basicamente na clivagem e remoção de bases danificadas por ação de DNA glicosilases e AP-endonuclease (da Costa e Menck 2004). Além das duas vias de reparo acima mencionadas, existe um sistema de três enzimas, cuja função é diminuir os efeitos deletérios da 8-oxoG. A 8-oxo-dGTPase (MTH1) evita a incorporação de 8-oxodGTP no DNA pela sua eliminação do *pool* de nucleotídeos por meio de hidrólise. O emparelhamento errôneo C:8-oxoG é reconhecido e a lesão

removida pela DNA glicosilase 8-oxo-G (OGG1). Finalmente, A:8-oxoG é alvo de MUTYH (do inglês *mutY glycosylase homologue*), responsável por retirar a adenina (Barnes e Lindahl 2004; van Loon et al. 2010). Ainda, dentre as vias envolvidas no reparo de danos oxidativos encontram-se o reparo de emparelhamento errôneo (MMR, do inglês *mismatch repair*), o qual repara bases mal pareadas durante a replicação do DNA (Russo et al. 2007) e consiste em reconhecimento da lesão, excisão da fita filha contendo a lesão, síntese e ligação da nova base (da Costa e Menck 2004); e, por fim, o reparo por recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*) e o reparo por junção de extremidades não-homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*) estão envolvidos no reparo de quebras de fita dupla, lesões altamente perigosas que podem gerar rearranjos genômicos e até mesmo morte celular (Chapman et al. 2012; Dizdaroglu 2012). O HR é bastante preciso, pois atua logo após a replicação do DNA e utiliza uma segunda cópia intacta no genoma como molde. Já o NHEJ é mais sujeito a erros, pois consiste na ligação das extremidades da dupla quebra, sem a necessidade de qualquer molde (da Costa e Menck 2004).

1.2.1. Estresse oxidativo e danos no DNA em DM1

Evidências apresentadas na literatura têm indicado uma associação entre o DM1 e o estresse oxidativo, este último pode ocorrer tanto como uma consequência da doença devido à hiperglicemia, quanto pode contribuir para a patogênese deste tipo de diabetes, pois moléculas reativas têm papel fundamental no dano às células β pancreáticas. A hiperglicemia pode levar a níveis elevados de estresse oxidativo por meio da produção direta de ROS ou via alterações na homeostase de reações de redução e oxidação através da perturbação de inúmeros mecanismos, incluindo indução da proteína quinase C, maior produção de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, maior fluxo da via poliol, elevada formação intracelular de produtos finais da glicação avançada (AGEs, do inglês *advanced glycation end-products*), dentre outros (Brownlee 2001; Ahmad et al. 2005; Rains e Jain 2011).

Por outro lado, foi relatado que ilhotas humanas apresentam níveis menores tanto proteicos quanto de atividade de duas enzimas relacionadas a defesa antioxidante, GPx ou CAT (Robertson e Harmon 2007; Tonooka et al. 2007; Drews et al. 2010). Assim, as células β apresentam maior sensibilidade ao estresse oxidativo e, ainda, indivíduos com predisposição genética apresentam células β mais suscetíveis à destruição autoimune mediada por citocinas (Delmastro e Piganelli 2011). Além disso, as APCs liberam citocinas e ROS, as quais causam danos às células β e contribuem para a geração de uma resposta imune adaptativa, que é essencial para a destruição autoimune (Murata et al. 2002; Torres e Forman 2003; Delmastro e Piganelli 2011).

De acordo com essa associação entre hiperglicemia e o aumento de ROS, Codoñer-Franch et al. (2010) relataram que crianças com DM1 com bom controle glicêmico apresentaram níveis significativamente maiores de marcadores de estresse oxidativo (níveis circulantes de lipoperóxidos e malondialdeído (MDA) e níveis plasmáticos de grupos carbonila) quando comparadas a crianças saudáveis. Em relação à defesa antioxidante, foram observadas uma ligeira redução na atividade de GPx em eritrócitos e uma redução significativa na razão α -tocoferol/colesterol total nos pacientes DM1 (Codoñer-Franch et al. 2010). Além disso, Matteucci e Giampietro (2000) encontraram níveis significativamente mais altos de MDA no plasma e nos eritrócitos não somente de pacientes com DM1, mas também de seus irmãos e pais não diabéticos, quando comparados com os respectivos controles.

Ainda, outro estudo indicou menor atividade de SOD e GPx em leucócitos de homens e mulheres com DM1 em relação aos respectivos grupos controles, além de níveis maiores de quebras no DNA e sítios sensíveis à FPG (do inglês *formamidopyrimidine DNA glycosylase*) (Dincer et al. 2003). Além disso, Goodarzi et al. (2010) observaram níveis significativamente elevados de MDA no plasma e de proteínas glicosiladas no soro de pacientes DM1 quando comparados ao grupo controle. Os autores também relataram concentrações significativamente mais altas de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) na urina de pacientes afetados pelo DM1 em relação a indivíduos saudáveis, sendo esses resultados consistentes com os de Hata et al. (2006). De forma semelhante, níveis significativamente aumentados de 8-OHdG e fragmentação do DNA nuclear foram também encontrados nos espermatozoides de pacientes em comparação com homens férteis não diabéticos (Agbaje et al. 2008). No que diz respeito a níveis de danos basais no DNA, Hannon-Fletcher et al. (2000) identificaram níveis significativamente mais altos em neutrófilos de pacientes DM1

relativamente a indivíduos saudáveis. Portanto, esses estudos reforçam a associação entre DM1, aumento do estresse oxidativo, distúrbio do sistema de defesa antioxidante e consequente indução de danos no DNA.

1.3. MicroRNAs

Os microRNAs são RNAs endógenos de fita simples, compostos por aproximadamente 22 nucleotídeos e que não codificam proteínas (Bartel 2004). Além disso, esses RNAs pequenos são evolutivamente conservados e atuam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica (Bartel 2004). Estima-se que em humanos, mais de 50% do transcriptoma está sob o controle de microRNAs (Bartel 2009; Rigoutsos 2009; Pasquinelli 2012), deste modo, os últimos estão envolvidos na regulação de vários processos biológicos, incluindo desenvolvimento, diferenciação, apoptose e proliferação (Bartel 2004). O primeiro dessa classe de RNAs, lin-4, foi descoberto no nemátodo *Caenorhabditis elegans* em 1993 (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993) e, a partir de então, centenas de microRNAs foram identificados não somente em animais, mas também em plantas e vírus (Lagos-Quintana et al. 2001; Lau et al. 2001; Lee e Ambros 2001; Berezikov et al. 2006; Ruby et al. 2006; Bushati e Cohen 2007), havendo mais de 2500 microRNAs maduros já descritos em humanos (miRBase release 21, junho 2014) (Griffiths-Jones 2004; Griffiths-Jones et al. 2006; Griffiths-Jones et al. 2008; Kozomara e Griffiths-Jones 2011).

Esses RNAs pequenos são encontrados em células e também em vários fluidos corporais, como por exemplo, soro, saliva, plasma, sangue total e urina, sendo os microRNAs vinculados a proteínas ou incorporados em microvesículas após serem secretados pelas células, impedindo assim, sua degradação (Moreno-Moya et al. 2014). Com exceção de alguns cuja degradação é mais rápida, os microRNAs apresentam grande estabilidade, além de uma meia-vida acima de 14 horas (Hwang et al. 2007; Kim et al. 2009).

O controle da expressão gênica mediada por esses RNAs endógenos garante uma regulação fina na expressão de proteínas em resposta a inúmeras condições celulares e de desenvolvimento (Bartel 2009; Hu e Collier 2012). Em animais, os microRNAs atuam geralmente por meio do pareamento parcial de bases a sítios localizados na região 3' não traduzida (3' UTR, do inglês 3' *untranslated*

region) dos mRNAs-alvos (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993; Lim et al. 2005; Bartel 2009; Krol et al. 2010). É importante ressaltar que sítios de ligação de microRNAs na região 5' UTR também foram descritos (Grey et al. 2010; Helwak et al. 2013), assim como em sequências codificadoras (Hafner et al. 2010; Reczko et al. 2012; Helwak et al. 2013). Embora tenha sido relatada a indução da tradução de mRNAs por microRNAs em algumas situações específicas (Vasudevan et al. 2007; Henke et al. 2008; Orom et al. 2008; Vasudevan et al. 2008; Niepmann 2009; Fabian et al. 2010), ao contrário, geralmente os microRNAs regulam negativamente seus alvos por meio da degradação e/ou inibição traducional dos últimos (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993; Lim et al. 2005; Bartel 2009; Krol et al. 2010).

O primeiro passo da biogênese dos microRNAs é a transcrição dos genes dos mesmos. Geralmente a transcrição é mediada pela RNA polimerase II (Pol II), gerando os microRNAs primários (pri-microRNAs), os quais possuem centenas a milhares de nucleotídeos de comprimento (Cai et al. 2004; Lee et al. 2004; Bushati e Cohen 2007) e contêm *cap* e cauda poli-A nas extremidades 5' e 3', respectivamente, semelhante à maioria dos transcritos da Pol II (Bracht et al. 2004; Cai et al. 2004; Lee et al. 2004; Finnegan e Pasquinelli 2013). Normalmente, sequências de microRNAs distintos estão contidas em cada pri-microRNA (Filipowicz et al. 2008). Os pri-microRNAs dobram sobre si mesmos formando estruturas tronco-alça, as quais são compostas por um tronco longo de cerca de 30 pares de bases com pareamento imperfeito e extremidades flanqueadoras 3' e 5' de fita simples (Zeng e Cullen 2005; Han et al. 2006; Filipowicz et al. 2008; UI Hussain 2012). Essas estruturas são características de pri-microRNAs e são reconhecidas ainda no núcleo pelo complexo microprocessador, formado pela enzima RNase III Droscha e a proteína que contém domínios de ligação a RNAs de fita dupla DGCR8 (do inglês *DiGeorge syndrome critical region gene 8*) e outros cofatores (Lee et al. 2003; Denli et al. 2004; Gregory et al. 2004; Han et al. 2006; Filipowicz et al. 2008; UI Hussain 2012).

O complexo microprocessador realiza a clivagem do tronco aproximadamente 11 nucleotídeos da base (UI Hussain 2012), o que gera uma estrutura tronco-alça de 60-70 nucleotídeos denominada microRNA precursor (pre-microRNA), o qual contém dois nucleotídeos não pareados na extremidade 3' e um fosfato na extremidade 5' (Du e Zamore 2005; Bushati e Cohen 2007; Peters e Meister 2007; Rana 2007; Zhang et al. 2007; Filipowicz et al. 2008; Moreno-Moya et al. 2014). Os nucleotídeos não pareados, o tronco de fita dupla apresentando comprimento mínimo de 15 pares de bases e *loops* terminais com pelo menos cinco nucleotídeos são importantes para a associação de exportina 5 (EXP5) ao pre-

microRNA (Gwizdek et al. 2003; Lund et al. 2004; Zeng e Cullen 2004; Okada et al. 2009; Finnegan e Pasquinelli 2013). Assim como outros receptores de transporte nuclear, EXP5 depende do cofator Ran-GTP para a exportação do pre-microRNA do núcleo para o citoplasma, onde o microRNA é liberado após a hidrólise de GTP (Kim et al. 2009). Uma vez no citoplasma da célula, a enzima RNase III Dicer associada à proteína que contém domínios de ligação a RNAs de fita dupla TRBP (do inglês *TAR RNA-binding protein*) cliva o pre-microRNA aproximadamente 22 nucleotídeos da extremidade 3', próximo ao *loop* terminal, gerando o microRNA de fita dupla com dois nucleotídeos não pareados em ambas as extremidades 3' (Bernstein et al. 2001; Hutvagner et al. 2001; Filipowicz et al. 2008; Ul Hussain 2012).

Após a ação de Dicer, o duplex de microRNA precisa ser desenrolado para que uma das fitas seja selecionada e atue como o microRNA maduro (Filipowicz et al. 2008; Finnegan e Pasquinelli 2013). Geralmente, a fita selecionada, denominada fita guia, é a que contém o pareamento de bases termodinamicamente menos estável na extremidade 5' (Khvorova et al. 2003; Schwarz et al. 2003; Finnegan e Pasquinelli 2013). Era suposto que a fita não selecionada, denominada passageira ou fita estrela (*), era rapidamente degradada; porém, em algumas situações, as fitas passageiras podem ser selecionadas e direcionar a repressão dos seus alvos (Okamura et al. 2008; Finnegan e Pasquinelli 2013).

A fita do duplex de microRNA selecionada é então incorporada a complexos ribonucleoproteicos (RNP), denominados miRNPs ou complexos de silenciamento induzido por microRNAs (miRISCs). A formação desses complexos é dinâmica e geralmente é acoplada ao processamento do pre-microRNA por Dicer, mas os detalhes ainda não são bem esclarecidos (Du e Zamore 2005; Bushati e Cohen 2007; Peters e Meister 2007; Rana 2007; Filipowicz et al. 2008). Os componentes principais e melhor caracterizados dos miRISCs são as proteínas Argonautas (AGO) (Peters e Meister 2007; Tolia e Joshua-Tor 2007; Filipowicz et al. 2008).

Além da via canônica da biogênese dos microRNAs, existe a via mirtrônica. Esta gera os mirtrons, que são derivados de íntrons excisados que se assemelham aos pre-microRNAs; assim, não precisam do processamento mediado pelo complexo microprocessador, mas sim de *splicing* seguido da desramificação de estruturas parecidas com laço e, por fim, do dobramento das estruturas desramificadas em estruturas tronco-alça que se assemelham aos pre-microRNAs. Os mirtrons são então sujeitos à via canônica. Dentre os organismos em que mirtrons já foram identificados encontram-se mamíferos, *D. melanogaster* e *C. elegans* (Berezikov et al. 2007; Okamura et al. 2007; Ruby et al. 2007; Kim et al. 2009; Winter et al. 2009).

As vias de biogênese dos microRNAs, compreendendo desde a transcrição até os mecanismos de controle da expressão gênica mediada pelos microRNAs (que serão discutidas a seguir), estão ilustradas na **Figura 2**.

Figura 2. Biogênese dos microRNAs. Os pri-microRNAs são transcritos e processados no núcleo em pre-microRNAs (via canônica) ou os pre-microRNAs são derivados de *splicing* (via mirtrônica). Os pre-microRNAs são então exportados para o citoplasma, onde são clivados em um duplex de microRNA, sendo uma das fitas incorporada ao complexo miRISC para guiar esse complexo proteico a sequências específicas localizadas em mRNAs-alvos (vias canônica e mirtrônica). Adaptado de Filipowicz et al. (2008).

1.3.1. Controle da expressão gênica por microRNAs

Os microRNAs direcionam as proteínas efetoras do miRISC em proximidade com o mRNA-alvo por meio do pareamento com sequências complementares presentes nesses alvos, deste modo, atuando como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica (Thomson et al. 2011). É esse pareamento de bases que torna esse processo específico (Ul-Hussain 2012). Em animais, o pareamento de bases entre os microRNAs e seus alvos geralmente é imperfeito e seguem algumas regras determinadas por meio de análises bioinformáticas e experimentais. O requerimento mais rigoroso é o pareamento de bases perfeito e contínuo dos nucleotídeos 2-8 contados a partir da extremidade 5' do microRNA, sendo essa região denominada *seed* (Doench e Sharp 2004; Brennecke et al. 2005; Lewis et al. 2005; Grimson et al. 2007; Nielsen et al. 2007; Filipowicz et al. 2008). Além de ser a região dos microRNAs mais frequentemente complementar aos sítios de ligação presentes nas regiões 3' UTR dos alvos (Stark et al. 2003; Thomson et al. 2011), a região *seed* é a mais conservada evolutivamente (Lewis et al. 2003; Lim et al. 2003; Thomson et al. 2011) e ainda, em várias situações, a complementaridade somente desta região é suficiente para o reconhecimento do mRNA-alvo (Lewis et al. 2003; Doench e Sharp 2004; Krek et al. 2005; Lewis et al. 2005; Thomson et al. 2011).

Quanto à região central do duplex microRNA-mRNA, mal pareamentos e protuberâncias devem estar presentes, o que previne a clivagem endonucleolítica do mRNA pela AGO2. No que diz respeito à região 3' do microRNA, mal pareamentos e protuberâncias são geralmente tolerados, mas deve haver um certo grau de complementaridade para estabilizar a interação (Doench e Sharp 2004; Brennecke et al. 2005; Lewis et al. 2005; Grimson et al. 2007; Nielsen et al. 2007; Filipowicz et al. 2008; Moreno-Moya et al. 2014). Devido ao fato desses elementos de reconhecimento serem curtos, um microRNA pode regular centenas de alvos, bem como cada alvo pode ser regulado por inúmeros microRNAs (Moreno-Moya et al. 2014).

Como mencionado anteriormente, com exceção de algumas situações específicas nas quais a indução da tradução de mRNAs por microRNAs foi observada (Vasudevan et al. 2007; Henke et al. 2008; Orom et al. 2008; Vasudevan et al. 2008; Niepmann 2009; Fabian et al. 2010), esses reguladores pós-

transcrpcionais da expressão gênica geralmente reprimem a expressão de seus alvos por meio da degradação e/ou inibição traducional dos últimos (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993; Lim et al. 2005; Bartel 2009; Krol et al. 2010). A degradação do mRNA pode ser mediada por dois mecanismos: clivagem endonucleolítica direta mediada pela AGO2 (Liu et al. 2004; Meister et al. 2004; Okamura et al. 2004; Bracken et al. 2011; Thomson et al. 2011) ou deadenilação e ataque exonucleolítico, sendo o último mecanismo o predominante em mamíferos, já que o primeiro ocorre somente na presença de complementaridade quase perfeita entre o microRNA e seu alvo (Bartel 2004; Behm-Ansmant et al. 2006; Thomson et al. 2011).

Em relação à tradução, foi relatado que a repressão deste processo por microRNAs pode ocorrer em sua iniciação devido à interferência com o processo de reconhecimento do *cap* ou à inibição da formação do complexo ribossômico 80S (Humphreys et al. 2005; Pillai et al. 2005; Wang et al. 2006; Chendrimada et al. 2007; Mathonnet et al. 2007; Thermann e Hentze 2007; Wakiyama et al. 2007; Wang et al. 2008a; Fabian et al. 2010). Ainda, foi proposto que a repressão traducional pode ocorrer pós-iniciação por meio da desassociação dos ribossomos ou degradação dos polipeptídeos nascentes por enzimas proteolíticas (Olsen e Ambros 1999; Nottrott et al. 2006; Petersen et al. 2006; Fabian et al. 2010). Apesar de ainda não ser esclarecido qual dos mecanismos (deadenilação/degradação do mRNA ou repressão da tradução) é o predominante, ou se um é consequência do outro, salvo algumas exceções, o resultado final da atuação dos microRNAs é geralmente a repressão da expressão de seus alvos.

1.4. Expressão de microRNAs e genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA em DM1

Alguns trabalhos da literatura investigaram os perfis de expressão gênica exibidos por pacientes DM1 comparados a indivíduos saudáveis por meio do método de microarranjos e identificaram genes diferencialmente modulados, cujas funções estão associadas ao estresse oxidativo e respostas a danos no DNA. Em um estudo foram detectados 30 genes diferencialmente expressos em células linfomononucleares provenientes de pacientes DM1, sendo que dentre os processos

biológicos atribuídos aos genes induzidos encontraram-se resposta ao estímulo de danos no DNA e estresse oxidativo (Rassi et al. 2006). Em outro trabalho, foram apontados 1.591 genes diferencialmente expressos em células progenitoras endoteliais (EPC, do inglês *epithelial progenitor cell*) de pacientes DM1 antes da suplementação com a vitamina B com propriedades antioxidantes ácido fólico comparados a indivíduos não diabéticos (van Oostrom et al. 2009). Esses genes foram classificados em termos GO, destacando-se “resposta ao estresse” e “resposta à hipóxia”. Após a suplementação com ácido fólico, 513 dos 1.591 genes diferencialmente expressos em EPCs dos pacientes foram normalizados a níveis similares aos do grupo controle, destacando-se dentre esses, genes que estão envolvidos em estresse oxidativo (van Oostrom et al. 2009).

Além disso, foram observados dois perfis de expressão diferentes exibidos por monócitos de crianças com DM1 recém-diagnosticado, sendo que um dos grupos de pacientes, denominado B, agrupou separadamente tanto do outro subgrupo de pacientes quanto do grupo controle. Dentre os genes induzidos em monócitos do grupo B encontraram-se mediadores de estresse oxidativo e dentre os reprimidos encontraram-se genes envolvidos em vias celulares antioxidantes (Irvine et al. 2012). Apesar desses estudos da literatura, informação sobre a expressão gênica transcricional em pacientes DM1, com enfoque em genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo e ao reparo do DNA ainda é escassa.

Em relação aos microRNAs, como mencionado anteriormente, esses RNAs pequenos estão implicados em vários processos biológicos como desenvolvimento, diferenciação, apoptose e proliferação (Bartel 2004). Entretanto, expressão alterada dos microRNAs também tem sido observada em inúmeras condições patológicas, incluindo vários tipos de câncer (Jamieson et al. 2012; Dong et al. 2013; Lin et al. 2013; Martin et al. 2013; Zhang et al. 2013), doenças cardiovasculares (Bostjancic et al. 2010; Danowski et al. 2013), e neurológicas (Minones-Moyano et al., 2011; Wong et al., 2013), bem como DM1 e nefropatia associada (Hezova et al. 2010; Sebastiani et al. 2011; Nielsen et al. 2012; Argyropoulos et al. 2013; Salas-Perez et al. 2013; Osipova et al. 2014). No entanto, apenas quatro outros estudos compararam a expressão de microRNAs em pacientes DM1 em relação a um grupo controle. Um desses estudos indicou que miR-342 e miR-191 são hipo-expressos e miR-510 é hiper-expresso em Tregs de pacientes DM1 (Hezova et al. 2010). Outro trabalho examinou os níveis de expressão dos microRNAs presentes no soro de crianças e

adolescentes com DM1 recém-diagnosticado e os resultados revelaram 12 microRNAs induzidos nesses pacientes: miR-152, miR-30a-5p, miR-181a, miR-24, miR-148a, miR-210, miR-27a, miR-29a, miR-26a, miR-27b, miR-25, miR-200a (Nielsen et al. 2012). Foi também demonstrado que os microRNAs miR-21a e miR-93 se encontraram significativamente reprimidos em PBMCs de crianças afetadas pelo DM1 crônico (Salas-Perez et al. 2013). Por fim, foi relatado que miR-21 e miR-210 se encontraram significativamente induzidos no plasma e urina de crianças e adolescentes com DM1, enquanto que miR-126 se encontrou significativamente reprimido na urina dos pacientes (Osipova et al. 2014). Apesar desses estudos da literatura, informação sobre a expressão desses reguladores da expressão gênica em pacientes DM1 ainda é escassa.

Portanto, visando proporcionar um melhor entendimento sobre as vias de regulação de genes participantes de processos biológicos relevantes para o desenvolvimento e/ou progressão do DM1, um campo bastante promissor é a investigação do envolvimento dessas pequenas moléculas reguladoras da expressão gênica em vias de resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA em pacientes afetados pelo DM1. Essa abordagem de integração dos dados de expressão em larga escala de microRNAs e de mRNAs (bem como de algumas proteínas) em pacientes DM1 comparados a indivíduos saudáveis não diabéticos ainda não foi descrita na literatura, podendo assim, proporcionar dados inéditos.

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

Pacientes DM1 apresentam perfis distintos de expressão de microRNAs e de genes relacionados a vários processos celulares (incluindo principalmente resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA) em relação a indivíduos saudáveis e os genes diferencialmente expressos podem ser regulados pelos microRNAs diferencialmente expressos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

Avaliar os perfis de expressão de microRNAs e os perfis de expressão de mRNAs, com enfoque principal em genes envolvidos em resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) provenientes de pacientes DM1 comparados aos indivíduos do grupo controle, buscando assim investigar possíveis interações entre microRNAs e mRNAs-alvo em DM1.

3.2. *Objetivos específicos*

- 1) Avaliar os perfis de expressão de microRNAs em PBMCs de pacientes DM1 comparados ao grupo controle por meio do método de microarranjos;
- 2) Identificar os microRNAs diferencialmente expressos com maior especificidade, buscando estratificar pacientes DM1 do grupo controle e apontar potenciais biomarcadores da doença;
- 3) Identificar os possíveis mRNAs-alvo dos microRNAs diferencialmente expressos, principalmente os associados à resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA;
- 4) Avaliar os perfis de expressão gênica transcricional em PBMCs de pacientes DM1 comparados ao grupo controle por meio do método de microarranjos;
- 5) Buscar genes com expressão significativa e grupos gênicos com expressão significativa ou significativamente enriquecidos em pacientes DM1 relativamente ao grupo controle, principalmente aqueles associados à resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA;
- 6) Confirmar a expressão de microRNAs e genes codificadores de proteínas selecionados que foram encontrados diferencialmente expressos (método de

microarranjos) e que estão relacionados à resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA por PCR quantitativa em tempo real;

- 7) Investigar a expressão proteica de alguns genes selecionados, implicados em resposta ao estresse oxidativo e nas vias de reparo do DNA, por meio do método *western blotting*;
- 8) Confirmar a ocorrência de interações microRNA-mRNA por meio do ensaio do gene repórter luciferase.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Casuística

Todos os voluntários (pacientes DM1 e indivíduos sadios não diabéticos) concordaram em participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**ANEXO A** e **ANEXO B**, respectivamente). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) (Processo HCRP nº 13314/2011; **ANEXO C**).

Foram avaliados 19 pacientes DM1 (12 do sexo masculino e sete do sexo feminino), incluídos na faixa etária de 18 a 37 anos. A seleção de todos os pacientes foi realizada no Ambulatório de Endocrinologia-Diabetes do Hospital das Clínicas. As principais características clínicas de todos os pacientes encontram-se na **Tabela 1**. Todos os pacientes faziam uso de insulina e apresentavam a doença há no mínimo dois anos. Os pacientes não apresentaram episódios recentes de cetoacidose e não possuíam complicações diabéticas como nefropatia consolidada, retinopatia proliferativa, síndrome do pé diabético, neuropatia autonômica e doenças cardiovasculares. A glicemia destes variou de 23 a 293 mg/dL, sendo que 12 pacientes foram considerados hiperglicêmicos, cinco hipoglicêmicos e dois com glicemia normal. Em relação à HbA1c, os valores variaram de 7,2 a 12,5%. Finalmente, nove dos 19 pacientes apresentaram pelo menos um de dois dos alelos *HLA* (*DQB1* *0201 ou *0302) que estão associados à suscetibilidade ao DM1 em brasileiros da região sudeste do país (Alves et al. 2006).

Em relação ao grupo controle, foram selecionados 11 indivíduos sadios não diabéticos (cinco do sexo masculino e seis do sexo feminino), incluídos na faixa etária de 20 a 31 anos. Foram excluídos indivíduos fumantes, etilistas, com sobrepeso/obesos, hipertensos, com histórico familiar de diabetes, infecções e uso crônico de medicamentos. Para melhor parear os controles com os pacientes, os primeiros foram selecionados de tal modo que cinco dos 11 possuísem pelo menos um alelo de suscetibilidade ao DM1 (*HLA-DQB1* *0201 ou *0302). As características dos indivíduos controles encontram-se na **Tabela 2**.

Tabela 1. Principais características clínicas dos pacientes DM1.

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Duração da doença (anos)	Insulina	Glicemia (mg/dL)	HbA1c (%)	HLA - DQB1
DM1_01	36	M	11	NPH 24 + 16 UI; Regular 13 UI	213	10,8	*0302 *0602
DM1_02*	23	M	13	Lanthus 28 UI; Lispro 4 + 2 + 2 UI	197	8,3	*0301 *0302
DM1_03*	24	M	6	NPH 36 + 30 UI; Regular 6 + 4 UI	260	10	*0302 *0501
DM1_04*	18	M	8	NPH 28 + 24 UI; Regular 10 + 10 UI	23	7,2	*0201 *0501
DM1_05 [♦]	23	M	20	NPH 50 + 30 UI; Regular 12 + 6 + 6 UI	178	10,1	*0202 *0501
DM1_06 [♦]	21	F	8	Ultra-rápida 42 + 6 UI	223	7,8	*0301 *0501
DM1_07 ^{*♦}	29	M	2	NPH 20 + 12 UI; Regular 6 UI	59	11,1	*0301 *0301
DM1_08 ^{*♦}	30	M	14	NPH 36 + 36 UI; Regular 10 + 10 UI	47	8,9	*0201 *0501
DM1_09 ^{*♦}	21	M	16	NPH 54 + 10 UI; Regular 8 + 10 UI	66	9	*0301 *0501
DM1_10 [♦]	28	F	5	NPH 34 + 22 UI	193	12,5	*0501 *0605
DM1_11 [♦]	29	M	3	NPH 24 + 12 UI; Regular 4 UI	225	9,8	*0302 *0604
DM1_12 [♦]	27	F	10	NPH 24 + 12 UI; Regular 6 + 6 UI	257	10,4	*0201 *0302
DM1_13	37	F	7	Lanthus 44 UI; Aspart 4 + 5 + 2 UI	82	8,4	*0501 *0501
DM1_14 ^{*♦}	24	F	14	Lanthus 34 UI; Regular 5 + 7 + 7 UI	293	8,5	*0302 *0501
DM1_15 [♦]	22	F	13	NPH 40 + 20 UI	143	8,3	*0303 *0501
DM1_16 ^{*♦}	18	M	5	NPH 20 + 10 + 15 UI; Regular 10 + 8 + 8 UI	60	9,5	*0301 *0302
DM1_17 ^{*♦}	25	F	6	NPH 66 + 6 UI; Regular 4 + 8 + 14 UI	85	10,5	*0301 *0402
DM1_18 [♦]	23	M	11	Glagina 34 UI; Aspart 4 + 6 + 6 UI	123	10,3	*0301 *0602
DM1_19 ^{*♦}	25	M	8	Levemir 20 + 20 UI	162	7,7	*0301 *0501

▪ Pacientes que fazem uso de metformina (850 mg)

* Pacientes cujas amostras foram utilizadas para os estudos dos perfis de expressão de microRNAs. Vale ressaltar que as amostras dos 19 pacientes foram utilizadas na análise dos dados de expressão de mRNA.

[♦] Pacientes cujas amostras foram utilizadas para a análise de expressão de proteínas selecionadas por *western blotting*.

Tabela 2. Principais características dos indivíduos sadios não diabéticos (controles).

Controles	Sexo	Idade (anos)	Glicemia (mg/dL)	HLA DQB1
CO_01*	M	28	92	*03:01 *03:02
CO_02*	F	25	86	*02:01 *02:02
CO_03*	F	27	88	*03:01 *03:02
CO_04*	F	26	90	*04:02 *06:04
CO_05*	M	25	94	*02:02 *03:01
CO_06*	F	29	82	*02:02 *03:01
CO_07*	M	20	87	*02:01 *06:03
CO_08*	F	20	87	*03:01 *03:01
CO_09*	M	26	81	*03:01 *03:03
CO_10	M	22	97	*05:01 *06:03
CO_11	F	31	93	*03:01 *03:02

* Controles cujas amostras foram utilizadas para os estudos dos perfis de expressão de microRNAs. Vale ressaltar que as amostras dos 11 controles foram utilizadas na análise dos dados de expressão de mRNA e que, exceto para CO_11, todas as outras amostras foram utilizadas para a análise da expressão de proteínas selecionadas por *western blotting*.

4.2. Coleta de sangue e separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Foram coletados 20 mL de sangue venoso periférico de cada voluntário em tubos vacutainer contendo EDTA (0,054 mL/tubo). Após a coleta, cada amostra foi mantida em gelo até a etapa de separação das PBMCs, que foi realizada no mesmo dia da coleta. Cada amostra foi diluída com solução salina 0,9% (1:1) e o sangue diluído foi então delicadamente adicionado a tubos contendo Fycoll-Hypaque (Sigma-Aldrich) (2:1) seguido de centrifugação a 425 x g por 15 minutos para a separação das PBMCs por meio de gradiente de densidade. O anel de PBMCs formado na interface plasma/Fycoll-Hypaque foi retirado e solução salina 0,9% foi adicionada para lavagem das PBMCs com posterior centrifugação a 106 x g por 7 minutos. Após o sobrenadante ser descartado, o precipitado de PBMCs foi ressuspenso em 200 µL de solução salina com adição de dietilpirocarbonato (DEPC). Finalmente, 3 mL de TRIzol (Invitrogen) foram adicionados para a extração do RNA total, DNA e proteínas.

4.3. Extração de RNA, quantificação e avaliação de sua qualidade

Para a extração de RNA total das PBMCs utilizando-se o reagente TRIzol (Invitrogen), 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol utilizado foram adicionados às amostras, que foram então divulsionadas vigorosamente por 15 segundos e em seguida, incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram então centrifugados a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C para separação da solução em fases aquosa e orgânica, com o RNA permanecendo exclusivamente na fase aquosa, a qual foi transferida para outro tubo onde 800 µL de isopropanol para cada 1 mL de TRIzol foram adicionados para a precipitação do RNA. Após o período de precipitação *overnight* a -20 °C, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com 1 mL de etanol 75% com adição de DEPC gelado para cada 1 mL de TRIzol. Durante cada uma das lavagens, as amostras foram divulsionadas vigorosamente por 1 minuto seguido de centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C. Após as lavagens e evaporação de todo o etanol, o RNA foi eluído em 15 µL de água com adição de DEPC.

Todas as preparações de RNA foram quantificadas e submetidas à avaliação quanto a sua pureza utilizando *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop Products). As contaminações com fenol ou proteínas foram monitoradas, sendo que somente as amostras que apresentaram razões dentro das faixas aceitáveis ($A_{260}/A_{230} = 1,8-2,2$ livre de fenol; $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$ livre de proteínas) foram utilizadas.

Para a avaliação da integridade do RNA, o *kit* RNA 6000 Nano (Agilent) e o bioanalisador 2100 (Agilent Technologies) foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante. Neste *kit*, o gel e as próprias amostras (100 ng de RNA total) foram aplicadas em nano chips, os quais contêm microcanais interconectados, sendo estes utilizados para separar os fragmentos por eletroforese. A integridade das amostras de RNA foi mensurada por meio do número de integridade do RNA (RIN, do inglês *RNA integrity number*) e somente as amostras com valores de RIN > 7,0 em uma escala até 10 foram utilizadas.

4.4. Extração do DNA e tipificação dos alelos de histocompatibilidade de classe II

Após a extração do RNA descrita anteriormente, a fase aquosa restante foi retirada e 300 µL de etanol absoluto foram adicionados para cada 1 mL de TRIzol utilizado, seguido de centrifugação a 2.000 x g por 5 minutos a 4 °C. A fase do Trizol foi retirada e ao precipitado foi adicionado 1 mL de citrato de sódio (0,1 M) em etanol 10% para cada 1 mL de TRIzol. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, sendo invertidas para homogeneização a cada 10 minutos e depois centrifugadas a 2.000 x g por 5 minutos a 4 °C. Novamente, 1 mL de citrato de sódio (0,1 M) em etanol 10% foi adicionado para cada 1 mL de TRIzol, seguido de incubação por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 2.000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e duas lavagens foram realizadas, onde 1,5 mL de etanol 75% foi adicionado para cada 1 mL de TRIzol em cada amostra, as quais foram então incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 2.000 x g por 10 minutos a 4 °C. Por fim, após secagem de excesso de etanol, o DNA foi eluído em 100 µL de tampão tris-ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (TE; 10 mM).

Após a extração do DNA, os alelos de classe II *HLA-DQB1* dos indivíduos estudados foram tipificados no laboratório de HLA do Hemocentro da FMRP-USP utilizando o *kit LABType® PCR-SSO® (polymerase chain reaction – specific sequence of oligonucleotides)*, com tecnologia Luminex (One Lambda Inc., Canoga Park, CA). O DNA foi amplificado por meio de iniciadores biotinilados e em seguida o DNA amplificado foi desnaturado e hibridado a sondas específicas (*HLA-DQB1*) ligadas a microesferas. Subsequentemente, as sondas foram marcadas com uma solução SAPE (do inglês *Streptavidin – Phycoerytherin*) e submetidas ao aparelho LABScan 100 (One Lambda Inc.) para leitura das mesmas. Para a análise dos dados, o *software HLA fusion 2.0* (One Lambda) foi utilizado.

4.5. Microarranjos de microRNAs

O *kit microRNA Complete Labeling and Hyb* (sistema monocolor) e as lâminas *Human miRNA V3 Microarray 8X15K* (cada uma contendo 8 x 15.000 oligos-

alvo) (Agilent Technologies) foram utilizados para a avaliação da expressão de microRNAs dos indivíduos estudados.

4.5.1. Amplificação e marcação de microRNAs

Foram adicionados a 100 ng de RNA total, 2 µL de *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) Master Mix* (0,4 µL de Tampão *Calf Intestinal Phosphatase* (10 X), 1,1 µL de água livre de nuclease e 0,5 µL de *Calf Intestinal Phosphatase*), seguido de incubação por 30 minutos a 37 °C para a desfosforilação do RNA. Após adição de 2,8 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) 100%, as amostras foram incubadas por 5-10 minutos em banho-maria a 100 °C e imediatamente colocadas em água com gelo para a desnaturação do RNA. Posteriormente, 4,5 µL de *Ligation Master Mix* (1,0 µL de Tampão T4 RNA Ligase (10 X), 3,0 µL de cianina 3-pCp e 0,5 µL de T4 RNA Ligase) foram adicionados às amostras, que foram então incubadas por 2 horas a 16 °C para a reação de ligação RNA-cianina 3-pCp. Esta marcação inclui os microRNAs presentes nas amostras. As amostras foram então submetidas à centrifugação a vácuo a 45-55°C em uma centrífuga evaporadora *Speed Vac® Plus* (Savant) para completa secagem, uma vez que resíduos de DMSO afetam a etapa de hibridação.

4.5.2. Hibridação das amostras com as lâminas de microarranjos e lavagem das lâminas

As amostras secas foram ressuspensas em 18 µL de água livre de nuclease e em seguida 4,5 µL de agente bloqueador (10 X) e 22,5 µL de Tampão de Hibridação Hi-RPM (2 X) foram adicionados a cada amostra, seguido de incubação por 5 minutos a 100 °C e imediatamente por 5 minutos em gelo. Por fim, as amostras foram aplicadas em lâminas de microarranjos de microRNA para hibridação por meio de incubação em um forno rotativo a 0,21 x g por 20 horas a 55

°C. O aparato de hibridação é separado por sistema de vedação, permitindo que em cada lâmina sejam realizadas hibridações de oito amostras simultaneamente.

Após a hibridação, as lâminas foram submetidas a lavagens com tampão 1 (Agilent Technologies) por 5 minutos à temperatura ambiente e em seguida com tampão 2 (Agilent Technologies) por 5 minutos a 37 °C. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em acetonitrila (Sigma-Aldrich) por 10 segundos e finalmente em solução de secagem e estabilização (Agilent Technology) por 30 segundos à temperatura ambiente, para posterior aquisição das imagens de hibridação em leitura de espectro verde 550 nm em um *scanner* de microarranjo de DNA com tecnologia de alta resolução *Surescan* (Agilent Technologies).

4.6. Microarranjos de mRNAs

O kit *LowInput QuickAmp Labeling* (sistema monocolor) e as lâminas *Human Genome 4x44 Oligo Microarrays* (cada uma contendo 4 x 44.000 oligos-alvo) (Agilent Technologies) foram utilizados para a avaliação da expressão de mRNAs dos indivíduos estudados.

4.6.1. Amplificação e marcação do RNA

O controle positivo da reação (*Spike-mix*) foi diluído três vezes (1:20, 1:25, 1:10) em tampão de diluição e 2 µL da terceira diluição e 1,8 µL de *T7 Promoter Primer Mix* foram adicionados a 200 ng de RNA total. Imediatamente após desnaturação do iniciador e das amostras por 10 minutos a 65 °C, procedeu-se com uma incubação por 5 minutos em gelo. Subsequentemente, cDNA foi sintetizado a partir do RNA total de cada amostra, adicionando-se 4,7 µL de *cDNA Master Mix* (2 µL de *first strand buffer* (5 X), 1 µL de DTT (0,1 M), 0,5 µL de dNTP *mix* (10 mM) e 1,2 µL de *AffinityScript RNase Block Mix*), seguido de incubação por 2 horas a 40 °C. Posteriormente, as enzimas foram inativadas incubando as amostras por 15 minutos em banho-maria a 70 °C, seguido de incubação por 5 minutos em gelo. Por

fim, cRNA marcado com cianina 3-CTP foi sintetizado adicionando-se 6 µL de *Transcription Master Mix* (0,75 µL de água livre de nuclease, 3,2 µL de tampão de transcrição (5 X), 0,6 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de NTP *mix*, 0,21 µL de *T7 RNA Polymerase Blend* e 0,24 µL de cianina 3-CTP) às amostras, com posterior incubação por 2 horas a 40 °C.

4.6.2. Purificação e quantificação do RNA amplificado e marcado

O RNA amplificado e marcado foi purificado utilizando-se o kit *Clean-up* (Illustra, GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante, através de ciclos de lavagens e centrifugações com dois tampões (RA1 e RA3) e etanol absoluto, seguido de eluição do RNA em 40 µL de água com adição de DEPC. O cRNA foi então quantificado utilizando-se *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop Products), sendo que somente as amostras cujo cRNA marcado apresentou concentração > 1,65 µg e atividade específica > 9,0 foram utilizadas para hibridação com as lâminas de microarranjos.

4.6.3. Hibridação das amostras com as lâminas de microarranjos e lavagem das lâminas

Para o processo de hibridação das amostras, 1,65 µg de cRNA marcado com cianina 3-CTP, 11 µL de agente bloqueador (10 X), volume suficiente para 52,8 µL de água livre de nuclease e 2,2 µL de tampão de fragmentação (25 X) foram misturados e incubados por exatamente 30 minutos a 60 °C para a fragmentação do cRNA. As amostras foram então imediatamente incubadas por 1 minuto em gelo. Para bloquear a reação de fragmentação, 55 µL de tampão de hibridação Hi-RPM (2 X) foram adicionados. Finalmente, as amostras foram aplicadas a lâminas de microarranjos de mRNA para hibridação por meio de incubação em um forno rotativo a 0,11 x g por 17 horas a 65 °C. O aparato de hibridação é separado por sistema de vedação, permitindo que em cada lâmina sejam realizadas hibridações de quatro

amostras simultaneamente. As etapas de lavagem das lâminas foram as mesmas descritas anteriormente para as lâminas de microRNA, com a diferença de que as lavagens nos tampões 1 e 2 foram realizadas por apenas 1 minuto.

4.7. Transcrição reversa (TR) e reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (qRT-PCR) de microRNAs

Taqman MicroRNA Assays (Applied Biosystems), os quais contêm os iniciadores para a TR e os iniciadores/sondas para a qRT-PCR, foram utilizados para realização da TR e da qRT-PCR, respectivamente, para a confirmação dos resultados de expressão obtidos para alguns microRNAs de interesse, hsa-miR-101 (MIMAT0000099) (002253), hsa-miR-148a (MIMAT0000243) (000470), hsa-miR-27b (MIMAT0000419) (000409) e hsa-miR-424 (MIMAT0001341) (000604), pelo método de microarranjos. Os microRNAs de interesse foram selecionados de acordo com o *fold change* (método de microarranjos) e alvos preditos (genes associados à resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA e que foram encontrados diferencialmente expressos por meio do método de microarranjos de mRNAs). Em relação aos controles endógenos, RNU6B (001093) e RNU48 (001006) foram selecionados com base em trabalhos existentes na literatura (Hezova et al. 2010; Salas-Perez et al. 2013), mas somente RNU48 foi utilizado nas análises pois sua expressão não variou entre os indivíduos estudados.

O *kit* de TR de microRNAs *Taqman*® (Applied Biosystems) foi utilizado para a reação da TR. Primeiramente, para cada reação de 15 µL, uma mistura contendo 0,15 µL de dNTPs (100 mM), 1,0 µL de transcriptase reversa *MultiScribe*^{TM} (50 U/µL), 1,5 µL de tampão de transcrição reversa (10 X), 0,19 µL de inibidor de RNase (20 U/µL) e 4,16 µL de água livre de nuclease, foi combinada a 10 ng de RNA total na proporção de 7 µL da mistura:5 µL de RNA total. Posteriormente, 3 µL do iniciador da TR foram adicionados a cada uma das reações, as quais foram incubadas por 5 minutos em gelo, seguido de incubação por 30 minutos a 16 °C, 30 minutos a 42 °C e 5 minutos a 85 °C. Os produtos da TR foram estocados a -20 °C até serem utilizados nos ensaios de qRT-PCR.

Com relação à qRT-PCR, a reação foi preparada com os seguintes reagentes: 5 µL de *Taqman Universal PCR Master Mix with AmpErase uracil N-glycosylase (UNG)* (2 X), 0,5 µL de *Taqman MicroRNA Assay* (20 X) (iniciadores/sondas), 3,7 µL de água livre de nuclease e 0,8 µL do cDNA proveniente da RT. As reações foram realizadas em triplicata e montadas em placas de 96 poços (*MicroAmp Fast Optical 96-well reaction plate with barcode*, 0.1 mL – Applied Biosystems), as quais foram então devidamente seladas com *MicroAmp Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems). Em seguida, as placas foram centrifugadas a 425 x g por 3 minutos. O aparelho utilizado foi o *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) e o programa foi o seguinte: incubação por 2 minutos a 50 °C para atividade da enzima uracila N-glicosilase, ativação da enzima Taq DNA polimerase por 10 minutos a 95 °C e 40 ciclos de desnaturação por 15 segundos a 95 °C e anelamento e extensão por 1 minuto a 60 °C.

4.8. TR e qRT-PCR de mRNAs

As moléculas de DNA presentes nas amostras de RNA foram removidas por meio do kit *Deoxyribonuclease I Amplification Grade* (Invitrogen), adicionando-se 1 µL de tampão de reação DNase I (10 X) e 1 µL de DNase I *Amplification Grade* (1 U/µL) a 1 µg de RNA total em um volume final de 10 µL e incubando a reação por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a inativação da DNase com a adição de 1 µL de EDTA (25 mM) e incubação por 10 minutos a 65 °C, o kit com a transcriptase reversa *Superscript III* (Invitrogen) foi utilizado para a TR. Primeiramente, 0,5 µL de iniciador oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µL) foi adicionado às amostras de RNA, que foram então incubadas por 10 minutos a 70 °C para desnaturação do RNA e ligação do iniciador e, em seguida, incubadas em gelo. Posteriormente, foi adicionada uma mistura contendo 4 µL de tampão da primeira fita (5 X), 2 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de transcriptase reversa *Superscript III* (200 U/µL) e 1 µL de dNTP (10 mM) (GE Healthcare UK), seguido de incubação por 50 minutos a 50 °C e posteriormente por 15 minutos a 70 °C.

Finalmente, o kit *Taq DNA polymerase recombinant* (Invitrogen) foi utilizado para realização de PCR convencional, com o objetivo de verificar se o cDNA foi eficientemente sintetizado. Para tanto, adicionou-se 2,5 µL de PCR *reaction buffer*

(10X), 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,3 µL de *Taq DNA polymerase recombinant* (5 U/µL), 0,5 µL de dNTP (10 mM) (GE Healthcare UK), 0,75 µL do iniciador GAPDH *forward* (5' CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC 3') e 0,75 µL do *reverse* (5' ACGACCAAATCCGTTGACTC 3') e 0,75 µL do cDNA proveniente da TR para um volume final de 25,75 µL. O programa utilizado consistiu de um primeiro passo por 5 minutos a 94 °C, 34 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 60 °C e 1 minuto a 72 °C e um passo final de 7 minutos a 72 °C. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese a 80 V por 1 hora em gel de agarose 2% para testar a integridade das amostras de cDNAs, que foram estocadas a -20 °C até serem utilizadas nos ensaios de qRT-PCR.

Em relação à qRT-PCR, a reação foi preparada com os seguintes reagentes: 5 µL de *Taqman Universal PCR Master Mix with AmpErase uracil N-glycosylase (UNG)*, 0,5 µL de *Taqman Gene Expression Assay* (20X) (iniciadores/sondas), 2,0 µL de água livre de RNase e 2,5 µL do cDNA proveniente da RT (em uma diluição 1:5). Os *Taqman Gene Expression Assays* utilizados foram para os genes de interesse *ATF3* (Hs00231069_m1), *TNFAIP3* (Hs00234713_m1), *PTGS2* (Hs00153133_m1), *UCP3* (Hs01106052_m1), *DUSP1* (Hs00610256_g1) e *FOSB* (Hs00171851_m1), bem como para os genes endógenos *GAPDH* (Hs02758991_g1) e *HPRT1* (Hs02800695_m1). Os genes de interesse foram selecionados de acordo com o *fold change* (método de microarranjos) e função (resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA), sendo que esses genes foram também preditos como alvos dos microRNAs encontrados diferencialmente expressos no presente trabalho. No caso de *UCP3*, apesar do baixo *fold change*, optamos por esse gene para ter pelo menos um reprimido, visto que os outros cinco selecionados encontraram-se induzidos. Em relação aos genes endógenos, estes foram selecionados de acordo com testes realizados pelo nosso grupo. A montagem da placa e o programa utilizado foram os mesmos descritos para microRNAs.

4.9. Extração e quantificação de proteínas

Para a extração de proteínas utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen), foram adicionados 300 µL de etanol absoluto por 1 mL de TRIzol seguido de incubação por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 2.000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante (contendo proteínas) foi então removido vagarosamente e

transferido para um tubo limpo. Após adição de 0,8 mL de isopropanol por 1 mL de TRIzol às amostras, procedeu-se incubação por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi submetido a três lavagens com 2 mL de uma solução de hidrocloreto de guanidina (0,3 M)-etanol 95% para cada 1 mL de TRIzol. Após adicionar essa solução, as amostras foram divulsionadas vigorosamente, incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, centrifugadas a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi removido. Subsequentemente, o precipitado foi transferido para um microtubo contendo 1,5 mL de etanol 100%, divulsionado vigorosamente e submetido à incubação por 20 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi submetido à centrifugação a vácuo em uma centrífuga evaporadora *Speed Vac® Plus* (Savant) por 3 minutos para secagem. Para dissolução do precipitado, foram adicionados 200 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%, seguido de incubação *overnight* a 60 °C. Por fim, as amostras foram submetidas à centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante (contendo proteínas) foi transferido para um microtubo limpo. As amostras foram estocadas a -20 °C até serem utilizadas no ensaio *western blotting*.

As amostras de proteína foram quantificadas utilizando-se o kit *BCA* (do inglês *bicinchoninic acid*) *Protein Assay* (Pierce) pela comparação com uma curva-padrão construída para a proteína soro albumina bovina (BSA). As amostras dos pacientes e indivíduos controles foram diluídas em SDS 1% (1:10) e o reagente de trabalho foi preparado (50:1, reagente A:B). As reações foram montadas em triplicata em placas de 96 poços, adicionando-se 10 µL de cada uma das diluições da proteína BSA (25-2.000 µg/mL), bem como 10 µL de cada amostra de interesse diluída, seguido de 200 µL do reagente de trabalho. Subsequentemente as placas foram incubadas por 30 minutos a 37 °C e as absorbâncias foram mensuradas ($\lambda = 562$ nm) utilizando *DTX 880 Multimode Detector* (Beckman Coulter).

4.10. Western blotting

A expressão das proteínas foi avaliada por SDS-PAGE utilizando-se géis de Bis-Tris 4-12% NuPAGE® (1,5 mm X 15 poços) (Novex by Life Technologies). Foram utilizados 30 µg de proteína para cada amostra, sendo que as linhagens

celulares humanas HeLa (câncer cervical) e U87 (glioblastoma) foram utilizados como controle positivo. Foram adicionados 2,5 µL de tampão de amostra LDS NuPAGE® (4 X) e 1 µL de agente redutor de amostra NuPAGE® (10 X) (Novex by Life Technologies) a cada amostra de proteína, as quais foram desnaturadas por 5 minutos a 100 °C e aplicadas ao gel. A eletroforese foi realizada em cubas *XCell SureLock™ Mini-Cell* (Invitrogen) contendo tampão de corrida SDS MOPS NuPAGE (Novex by Life Technologies) a 80 V por 30 minutos, 100 V por 1 hora e 125 V por 1 hora. Em seguida, a transferência das proteínas do gel para membranas Invitrolon™ PVDF (poros de 0,45 µm) (Invitrogen) foi realizada através do sistema *XCell II™ Blot Module* (Invitrogen) utilizando tampão de transferência NuPAGE® (Novex by Life Technologies) contendo metanol a 20% a 30 V por 5 horas a 4 °C .

O sistema de imunodeteção cromogênica *WesternBreeze®* (Novex by Life Technologies) foi utilizado para a imunodeteção e a visualização das proteínas. As membranas foram imersas em 8 mL de solução bloqueadora por 1 hora em um *shaker* rotatório. Subsequentemente, as mesmas foram enxaguadas com 20 mL de água deionizada durante 5 minutos e incubadas com 8 mL da solução de anticorpo primário *overnight* a 4 °C. Os anticorpos empregados neste trabalho foram os seguintes: anti-ATF3 [44C3a] (ab58668, Abcam – produzido em camundongo) (1:500), anti-COX2 [EP1978Y] (PTGS2) (ab62331, Abcam – produzido em coelho) (1:1000) e anti-DUSP1 (SAB1402176, Sigma-Aldrich – produzido em camundongo) (1:500). As proteínas de interesse foram selecionadas de acordo com os resultados de expressão gênica gerados a partir dos dados de microarranjos e qRT-PCR (genes diferencialmente expressos envolvidos em resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA e que foram preditos como alvos dos microRNAs encontrados diferencialmente expressos no presente trabalho). Em relação aos controles endógenos, os anticorpos empregados neste trabalho foram anti-β-actina (Cell Signaling Technology – produzido em coelho) (1:2000) e anti-β-tubulina (Santa Cruz Biotechnology – produzido em camundongo) (1:500). Após a incubação com a solução de anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes com 20 mL de solução de lavagem para anticorpos por 5 minutos. Posteriormente, as membranas foram incubadas em 8 mL da solução de anticorpo secundário por 30 minutos, seguindo-se três lavagens com 20 mL de solução de lavagem para anticorpos por 5 minutos. As membranas foram então enxaguadas 2 vezes com 20 mL de água deionizada por 2 minutos e incubadas com 5 mL de substrato

cromogênico por 1 hora. Por fim, as membranas foram lavadas 2 vezes com água deionizada e secas com papel de filtro.

4.11. Ensaio do gene repórter luciferase

O ensaio do gene repórter luciferase foi empregado para verificar a possibilidade de ocorrência das interações preditas hsa-miR-148a (MIMAT0000243)/*DUSP1* e hsa-miR-148a (MIMAT0000243)/*PTGS2* em meio celular. Essas interações foram selecionadas de acordo com as funções dos genes e a partir dos resultados obtidos pelos métodos de microarranjos, qRT-PCR e *western blotting*.

4.11.1. Preparação de células *Escherichia coli* quimio-competentes

Bactérias *E. coli* da cepa TG1 foram plaqueadas em Luria Bertani (LB) ágar (1 X) (Sigma-Aldrich) e incubadas por 16 horas a 37 °C. Colônias isoladas foram selecionadas e adicionadas a 20 mL de meio LB líquido (2 X) (Sigma-Aldrich), seguido de incubação por 4 horas a 37 °C sob agitação (2 x g). Subsequentemente, as bactérias em LB líquido foram transferidas para tubos previamente refrigerados a -20 °C, incubadas por 10 minutos em gelo e centrifugadas a 1.301 x g por 6 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então retirado e o precipitado foi ressuspenso em 20 mL de tampão FSB gelado (2 mL de KAc (1 M) (pH 7,5), 1,782 g de MnCl₂.4H₂O, 0,294 g de CaCl₂.2H₂O, 1,492 g KCl, 0,16 g de cloreto de hexaminocobalto e 90 mL de glicerol para volume total de 200 mL), seguido de incubação por 10 minutos em gelo. Após esse passo, os tubos foram mais uma vez centrifugados a 1.301 x g por 6 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi retirado e o precipitado foi ressuspenso em 4 mL de tampão FSB gelado. Em seguida, 140 µL de DMSO foram adicionados à mistura, a qual foi incubada por 15 minutos em gelo. Por fim, mais 140 µL de DMSO foram adicionados e as bactérias competentes foram estocadas a -80 °C até o passo da transformação.

4.11.2. Seleção e desenho dos oligonucleotídeos

Para a seleção dos sítios preditos de ligação do microRNA hsa-miR-148a-3p localizados nas regiões 3' UTR dos mRNAs de *DUSP1* e *PTGS2*, utilizou-se a ferramenta RNAhybrid (<http://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) (Rehmsmeier et al. 2004). Esta proporciona a energia livre mínima de hibridação (mfe, do inglês *minimum free energy*) entre um RNA longo (alvo) e um RNA pequeno (microRNA), sendo selecionada para cada mRNA a interação que apresentou o menor valor de energia livre de hibridação, com o *threshold* sendo -20 kcal/mol.

Os oligonucleotídeos selvagens referentes à porção da região 3' UTR de *DUSP1* e *PTGS2* contendo os respectivos sítios preditos de ligação do microRNA hsa-miR-148a-3p foram desenhados de tal modo que os sítios de ligação estivessem flanqueados por bases *upstream* e *downstream* de forma a não ultrapassar um total de 200 pares de bases (*DUSP1*, 180 pares de base; *PTGS2*, 191 pares de base). As bases AAA foram adicionadas à região 5' UTR da sequência, bem como o sítio de restrição da enzima XbaI (TCTAGA) à região 3' UTR *upstream* das últimas 15 bases. Para cada oligonucleotídeo selvagem, mutações de ponto foram introduzidas na sequência de ligação do microRNA, bem como em outras regiões da sequência selvagem, de forma que a energia livre de hibridação aumentasse, com o *threshold* sendo -15 kcal/mol. Os oligonucleotídeos selvagens e os mutantes, designados “wt” e “mut”, respectivamente, foram sintetizados em fita dupla (*gBlocks® gene fragments*) por *Integrated DNA Technologies*.

4.11.3. Digestão e ligação do vetor e oligonucleotídeos

O vetor pmirGLO (1 µg) (Promega Corporation) foi digerido pelas enzimas de restrição DraI (10 U/µL; Promega Corporation) e XbaI (10 U/µL; Promega Corporation) e os oligonucleotídeos (100 ng) somente pela XbaI por meio de incubação por 4 horas a 37 °C em banho-maria. Para a ligação entre os oligonucleotídeos (4 ng/µL) e o vetor pmirGLO (50 ng), a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) foi utilizada, sendo a reação de ligação incubada por 10 minutos à

temperatura ambiente e por 24 horas a 4 °C. Deste modo, os oligonucleotídeos foram anelados e clonados no vetor entre os sítios de restrição das enzimas DraI e XbaI, com o sítio de ligação do microRNA na orientação 5' a 3' correta, imediatamente 3' *downstream* do gene da luciferase de vagalume. Os plasmídeos recombinantes foram estocados a -20 °C até o passo da transformação.

4.11.4. Transformação do plasmídeo recombinante em *E. coli* quimio-competentes

Para a transformação de bactérias *E. coli* da cepa TG1 quimio-competentes, as mesmas foram adicionadas ao produto resultante de cada reação de ligação, seguido de incubação por 15 minutos em gelo, 90 segundos a 42 °C em banho-maria e 1 minuto em gelo. Após o choque térmico, as misturas foram adicionadas a tubos contendo 800 µL de meio SOC (935 µL de meio LB líquido, 10 µL de KCl (250 mM), 5 µL de MgCl₂ (2 M), 10 µL de MgSO₄ (1 M) e 40 µL de glicose (20 mM) para volume total de 1 mL) e incubadas por 1 hora a 37 °C sob agitação (2 x g). Subsequentemente, os tubos foram centrifugados a 3.824 x g por 2 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi retirado e o precipitado ressuspensionado em 100 µL de meio SOC. Para a seleção das bactérias transformadas, visto que o vetor contém a região codificadora de β-lactamase (Amp^r), a mistura foi plaqueada em LB ágar (1 X) (Sigma-Aldrich) contendo ampicilina (0,067 mg/mL) (Sigma-Aldrich) e incubada por 14 horas a 37 °C, sendo as placas estocadas a 4 °C até o próximo passo.

Colônias isoladas foram selecionadas e cultivadas em 2 mL de meio LB líquido (2 X) (Sigma-Aldrich) contendo ampicilina (0,2 mg/mL) (Sigma-Aldrich) por 14 horas a 37 °C sob agitação (2 x g). Após essa incubação, os tubos foram estocados a 4 °C até a realização da PCR convencional para verificar se os vetores transformados nas bactérias *E. coli* quimio-competentes continham as construções selvagens e mutadas. Para a PCR, foram utilizados os iniciadores, *forward* 5' AGGTTACAACCGCCAAGAAG 3' e *reverse* 5' CAGCCAACCTCAGCTTCCTTT 3', os quais flanqueiam o sítio policlonal do vetor. O programa utilizado foi o seguinte: incubação por 5 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C e, em seguida, incubação por 10 min a 72 °C.

4.11.5. Purificação do plasmídeo recombinante

Após confirmar que os vetores transformados nas bactérias *E. coli* quimio-competentes continham as construções selvagens e mutadas, o sistema de purificação de DNA *Wizard® Plus SV Minipreps* (Promega Corporation) foi utilizado para isolamento do DNA plasmidial, de acordo com protocolo do fabricante, através de lise celular e ciclos de lavagens e centrifugações, sendo o DNA eluído em 100 µL de água livre de nuclease.

4.11.6. Avaliação da luminescência relativa

Para o passo da transfecção, foi preparada uma mistura contendo 0,2 µg da construção pmirGLO (DUSP1(wt), DUSP1(mut), PTGS2(wt) ou PTGS2(mut)), 0,75 µL do mímico do microRNA de interesse (hsa-miR-148a – MIMAT0000243) (2 µM) (Thermo Scientific Dharmacon), 1,5 µL do reagente de transfecção *Attractene* (Qiagen) e 60 µL de meio de cultura MEM α (do inglês *minimum essential medium*) (pH 7,0; Gibco) por poço. Essa mistura foi divulsionada vigorosamente e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e, então, adicionada às células HEK-293T (6x10⁴ células/poço), cultivadas em meio de cultura DMEM F12 (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (pH 6,8; Sigma-Aldrich) suplementado com soro fetal bovino 15% e os antibióticos penicilina (125 U/mL) e streptomina (125 U/mL). A contagem das células, bem como a viabilidade das mesmas (mais de 90% das células se encontravam viáveis) foram avaliadas pelo *Cellometer Auto T4 Cell Counter* (Nexcelon Bioscience). As células e a mistura de transfecção foram distribuídas em uma placa de 96 poços, seguido de incubação a 5% CO₂ a 37 °C em incubadora umidificada, sendo que 36 horas após as transfecções o meio foi retirado e as células lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) (1 X). Em seguida, as células foram lisadas adicionando 20 µL de tampão de lise passiva (Promega Corporation) por poço e incubando por 30 minutos em *shaker*. Subsequentemente, para o ensaio do gene repórter luciferase, foi utilizado o *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega Corporation). Para tal, 100 µL do reagente do ensaio da luciferase II e

posteriormente 100 μ L do reagente *Stop & Glo*® foram adicionados às células lisadas para mensurar as atividades da luciferase de vagalume e da luciferase de *Renilla*, respectivamente, usando o leitor de microplacas *Synergy*^{TM} 2 (Biotek). Todo o procedimento foi realizado em quintuplicata. Se houver interação entre o microRNA e a região 3' UTR do mRNA de interesse, a atividade da luciferase é reduzida ou totalmente inibida. Não havendo interação, a atividade da luciferase é consistente.

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Imunogenética Molecular do Departamento de Genética da FMRP-USP, o qual possui a permissão de biossegurança CTNBio (No. 0040/98).

ANÁLISE DOS RESULTADOS

5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

5.1. Expressão gênica obtida por microarranjos

As análises dos dados de microarranjos de microRNA e mRNA foram realizadas por meio de duas linguagens de programação: R e PERL. O R é uma linguagem e ambiente estatístico que pode ser ampliado por meio de vários pacotes com inúmeras funções (R Development Core Team 2006 – <http://www.r-project.org>), sendo que as análises nesse ambiente foram executadas no sistema operacional *Microsoft Windows*. A linguagem de alta capacidade Perl (*The Perl Programming Language* – www.perl.org), por sua vez, foi utilizada para o processamento dos dados a serem importados para o ambiente R, sendo que as análises em Perl foram executadas no sistema operacional UNIX.

5.1.1. MicroRNAs

5.1.1.1. Quantificação, correção do background, normalização e remoção das amostras outliers

O software *Feature Extraction* (FE), versão 10.7 (Agilent Technologies), foi utilizado para o controle de qualidade das hibridações e para a quantificação das imagens das lâminas de microarranjos, ou seja, extração dos valores numéricos a partir das imagens de hibridação. Para a extração dos dados foi usado o protocolo *miRNA_107_Sep09*. Em seguida, no sistema operacional UNIX, as medianas de ambos os dados brutos (*gMedianSignal*) e do *background* (*gBGMedianSignal*) foram selecionadas da tabela de dados quantificados gerando um arquivo com extensão “.new” para cada uma das amostras. Esses arquivos foram então importados para o ambiente estatístico R (versão 2.15.1), onde foram realizadas a correção do *background* ($gMedianSignal - gBGMedianSignal$) e também a transformação dos

dados em escala logarítmica ($\log_2$), gerando um único arquivo contendo os valores de expressão corrigidos de todos os indivíduos estudados.

Subsequentemente, ainda no ambiente R, os dados brutos foram normalizados pelo método quantile (normalização inter-arranjos, para tornar as amostras comparáveis entre si) através do pacote *aroma-light* (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/aroma.light.html>) (Bengtsson Preprint 2004:18), com os dados normalizados sendo visualizados por meio de gráficos em formato *boxplot*.

Posteriormente, procedeu-se a análise para detectar amostras *outliers*. Para tal, foi efetuada a correlação inter-arranjos (IAC, do inglês *inter-array correlation*) no ambiente R, que proporcionou a detecção de amostras com níveis de expressão gênica divergentes de uma maneira não-enviesada (Oldham et al. 2008), usando o pacote Cluster (cran.r-project.org/package=cluster) (Maechler et al. 2013). Após a remoção das amostras consideradas *outliers*, os dados obtidos por meio do FE foram novamente submetidos ao ajuste do *background* e à normalização pelo método quantile.

5.1.1.2. Análise estatística e geração das curvas de característica de operação do receptor (ROC, do inglês *receiver-operating characteristic*)

Para obter uma lista contendo os microRNAs diferencialmente expressos, a análise *rank products* foi efetuada, utilizando o pacote RankProd (Hong et al. 2006) no ambiente R. No presente estudo, foram considerados como significativos os microRNAs que apresentaram valores de $p < 0,01$, juntamente com a porcentagem de falsos-positivos (PFP, do inglês *percentage of false-positives*) $< 0,05$. Em seguida, com o intuito de eliminar problemas de múltiplas sondas correspondentes a um mesmo microRNA, a mediana dos dados de expressão dessas múltiplas sondas foi calculada, mantendo-se apenas um valor de expressão para cada sonda.

Para investigar o poder discriminatório dos microRNAs diferencialmente expressos em estratificar os pacientes DM1 dos indivíduos sadios, curvas ROC foram geradas e as áreas sob as curvas (AUC, do inglês *area under the curve*) foram calculadas no ambiente R usando os pacotes ROCR (<http://cran.r->

project.org/web/packages/ROCR/index.html) (Sing et al. 2005) e *gplots* (<http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>) (Warnes et al. 2013). Os microRNAs que apresentaram valores de $AUC \geq 0,90$ foram considerados para as análises posteriores. Com esses parâmetros rigorosos buscamos apontar microRNAs com o potencial de servirem como marcadores da doença. Em seguida, para visualizar o perfil de expressão desses microRNAs exibidos por PBMCs de pacientes DM1 quando comparados ao grupo controle, a análise de agrupamento hierárquico foi realizada no ambiente R usando a função *hclust* (<http://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/hclust.html>) e o pacote *gplots* (<http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>) (Warnes et al. 2013), com o dendograma sendo construído utilizando a função *heatmap.2* (<http://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/hclust.html>). Utilizamos distância de Pearson não centralizada com ligação média.

5.1.1.3. Predição dos alvos dos microRNAs e análise de anotação funcional

Para investigar suas funções, os microRNAs diferencialmente expressos que apresentaram valores de $AUC \geq 0,90$ foram submetidos à ferramenta *miRWalk* (Dweep et al. 2011) para a predição dos alvos. A lista dos genes induzidos foi submetida separadamente da lista dos genes reprimidos. Essa ferramenta possibilita fazer a intersecção dos resultados obtidos por nove programas de predição de alvos de microRNAs: *miRWalk* (março 2011 *release*), *Diana-microT* (versão 3.0), *miRanda* (agosto 2010 *release*), *miRDB* (abril 2009 *release*), *PICTAR* (março 2007 *release*), *PITA* (agosto 2008 *release*), *RNA22* (maio 2008 *release*), *RNAhybrid* (versão 2.1) e *Targetscan* (versão 5.1). Apenas as interações microRNA-alvo nas regiões 3' UTR de todos os genes humanos que foram identificadas por no mínimo cinco programas de predição foram consideradas para as análises posteriores.

Em seguida, para interpretar o significado biológico dessas interações preditas, as duas listas dos alvos preditos foram submetidas separadamente à ferramenta de anotação funcional *DAVID* (do inglês *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* – <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Huang et al. 2009b; Huang et al. 2009a) versão 6.7. As vias da *Kyoto Encyclopedia of Genes and*

Genomes (KEGG) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) foram utilizadas na presente análise, sendo que as redundantes foram removidas manualmente. As vias contendo pelo menos três genes e que apresentaram *escore* EASE, com correção de Benjamini-Hochberg $< 0,05$ foram consideradas significativas.

Por fim, a análise de anotação funcional apontou várias vias associadas ao câncer. Por este motivo, a ferramenta VENNY (Oliveros 2007), a qual compara listas por meio de diagramas de *Venn*, foi utilizada para comparar a lista dos 44 microRNAs diferencialmente expressos (resultados do presente trabalho) com uma lista de 52 microRNAs que foram encontrados diferencialmente expressos em duas linhagens humanas tumorais (K562, linhagem celular de crise blástica de leucemia mielóide crônica e HL60, linhagem celular de leucemia promielocítica aguda) quando comparadas com PBMCs normais pelo método de sequenciamento profundo de RNAs pequenos (Vaz et al. 2010).

5.1.2. mRNAs

5.1.2.1. Quantificação, correção do *background*, normalização, ajuste dos dados, remoção das amostras outliers e análise estatística

Para a extração dos dados utilizando-se o *software* FE, foi usado o protocolo GE1_107_Sep09. Em seguida, a correção do *background* foi efetuada assim como descrito para microRNAs e, posteriormente, a mediana dos dados de expressão das múltiplas sondas foi calculada, mantendo-se apenas um valor de expressão para cada sonda. Visto que duas versões diferentes de lâminas foram utilizadas com o intuito de investigar o maior número de indivíduos possíveis, procedeu-se a junção de ambas de acordo com as sondas compartilhadas no sistema operacional UNIX, resultando em um total de 18.561 sondas distintas. Subsequentemente, os dados de expressão de mRNAs foram normalizados como descrito para os dados de microRNAs. Em seguida, os dados normalizados foram submetidos ao método Bayes empírico através da ferramenta ComBat em ambiente R (<http://www.bu.edu/jlab/wp-assets/ComBat/Abstract.html>) (Johnson et al. 2007) para

filtrar as variações não-biológicas, ou seja, os artefatos experimentais, sendo que as amostras foram agrupadas por data de marcação/hibridação. Posteriormente, procedeu-se a análise para detectar amostras *outliers*, conforme descrita para microRNAs. Visto que nenhuma amostra foi considerada *outlier*, procedeu-se à PCA (do inglês *principal component analysis*) para visualizar a eliminação de artefatos experimentais através do pacote Ade4 em R (Chessel et al. 2004). A PCA combina várias dimensões em um espaço dimensional menor por meio de combinações lineares (eixos principais) de dimensões, facilitando a visualização dos dados.

Para obter uma lista contendo os genes diferencialmente expressos, a análise *rank products* foi efetuada assim como para os dados de microRNAs. Os genes que apresentaram valores de $p < 0,05$, juntamente com $PFP < 0,05$, foram considerados significativamente induzidos ou reprimidos. Em seguida, com o intuito de eliminar problemas de múltiplos dados de expressão correspondentes a um único gene, a mediana desses múltiplos dados de expressão foi calculada, mantendo-se apenas um valor de expressão para cada gene.

Com a finalidade de investigar se dentre os genes diferencialmente expressos estavam incluídos genes candidatos ao DM1, a ferramenta Venny (Oliveros 2007) foi utilizada. Foi obtido um total de 76 genes candidatos ao DM1 por meio do banco de dados T1Dbase (última atualização em 15 de outubro de 2013 – <http://www.t1dbase.org/page/Regions/display/species/human/disease/1/type/assoc>) (Burren et al. 2011). T1Dbase contém uma tabela de regiões de suscetibilidade ao DM1, bem como genes candidatos à doença, que foram identificados por meio de estudos de associação em escala genômica (GWAS, do inglês *genome wide association studies*). Os 76 genes candidatos ao DM1 utilizados na presente análise foram: *PTPN22*; *IL10*; *CD55*; *ADCY3*; *PTRHD1* (*C2orf79*); *CENPO*; *DNAJC27*; *DNMT3A*; *EFR3B*; *POMC*; *AFF3*; *IFIH1*; *STAT4*; *CTLA4*; *CCR5*; *IL2*; *IL21*; *KIAA1109*; *HLA-DQB1*; *HLA-DRB1*; *HLA-B*; *HLA-A*; *BACH2*; *MAP3K7*; *CENPW*; *TAGAP*; *C6orf120*; *DLL1*; *FAM120B*; *PHF10*; *PSMB1*; *TBP*; *TCTE3*; *WDR27*; *SKAP2*; *IKZF1*; *COBL*; *GLIS3*; *IL2RA*; *PRKCQ*; *RNLS* (*C10orf59*); *INS*; *INS-IGF2*; *CD69*; *ERBB3*; *CYP27B1*; *METTL1*; *SH2B3*; *GPR183*; *DLK1*; *RTL1*; *RASGRP1*; *CTSH*; *CLEC16A*; *DEXT*; *CIITA*; *SOCS1*; *IL27*; *CCDC101*; *NUPR1*; *EIF3C*; *SULT1A1*; *SULT1A2*; *CLN3*; *GSDMB*; *ORMDL3*; *PTPN2*; *CD226*; *TYK2*; *FUT2*; *UBASH3A*; *HORMAD2*; *MTMR3*; *LIF*; *IL2RB*; *C1QTNF6*.

5.1.2.2. Análise de grupos gênicos: GSA (do inglês *gene set analysis*) e GSEA (do inglês *gene set enrichment analysis*)

Visando entender se processos biológicos são relevantes em genes de baixa expressão, os dados normalizados e ajustados foram submetidos à análise de grupos gênicos, a qual examina grupos de genes de uma mesma classe com o intuito de identificar se a mesma encontra-se diferencialmente expressa e/ou diferencialmente enriquecida, sendo que nem todos os genes pertencentes a essa determinada classe necessariamente apresentam (individualmente) expressão estatisticamente significativa.

A análise de grupos gênicos comparando pacientes com DM1 aos indivíduos saudáveis foi executada utilizando o *BRB-ArrayTools* (desenvolvido por: Richard Simon e *BRB-ArrayTools Development Team*) para identificar grupos gênicos com expressão significativa (GSA) e grupos gênicos significativamente enriquecidos (GSEA), os quais foram selecionados a partir de termos *Gene Ontology* (GO). As listas de genes normalizados pelo método quantile e ajustados pelo método Bayes empírico foram utilizadas na presente análise. Os testes de permutação *Efron–Tibshirani's GSA maxmean* e LS/KS foram realizados, sendo considerado o *threshold* de 0,005 para filtrar os grupos gênicos significativamente expressos e significativamente enriquecidos, respectivamente. Para o teste *Efron–Tibshirani's GSA maxmean* foram utilizadas 1000 permutações.

5.1.2.3. Priorização gênica

Em relação à análise de genes individuais, a ferramenta Endeavour (<http://homes.esat.kuleuven.be/~bioiuser/endeavour/index.php>) (Aerts et al. 2006) foi utilizada no presente trabalho para a priorização de genes de interesse em relação a processos biológicos de interesse. Essa ferramenta é baseada no ranqueamento dos genes de interesse de acordo com sua similaridade com genes cuja associação aos processos biológicos em questão já é bem estabelecida (genes de treinamento).

No presente estudo, os genes de treinamento foram importados para a ferramenta automaticamente baseando-se nos termos GO “resposta ao estresse oxidativo” (GO:0006979) e “reparo do DNA” (GO:0006281). Já os genes de interesse foram compostos pelos genes diferencialmente expressos em pacientes DM1 comparados ao grupo controle. Ainda, todos os bancos de dados disponíveis na ferramenta foram utilizados para a priorização gênica.

5.1.3. Interação microRNA-mRNA

Com o intuito de detectar genes diferencialmente expressos que são potenciais alvos dos microRNAs com expressão modulada (induzidos ou reprimidos), os alvos preditos (pela ferramenta miRWalk) dos microRNAs diferencialmente expressos que apresentaram valores de $AUC \geq 0,90$ foram comparados aos genes diferencialmente expressos por meio da ferramenta VENNY (Oliveros 2007).

5.2. Expressão de microRNAs e mRNAs por qRT-PCR

O método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi utilizado para calcular a expressão de cada microRNA e gene (mRNA) de interesse. Os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foram obtidos pelo *software* StepOne versão 2.3 (Applied Biosystems). Esses valores foram exportados para planilhas do Microsoft Office Excel (2007), nas quais, os valores de *fold change* por microRNA/gene de interesse por indivíduo foram calculados (valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ por microRNA/gene de interesse por indivíduo dividido pela média dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dos indivíduos do grupo controle). Esses valores de *fold change* foram então importados para o GraphPad Prism, versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EUA – www.graphpad.com) para a realização das análises estatísticas e construção dos gráficos. Primeiramente, para cada microRNA/gene, os dois grupos (pacientes e controles) foram submetidos ao teste de normalidade *D’Agostino-Pearson omnibus K2*, com posterior utilização ou do teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney ou do

teste F para testar as variâncias dos grupos, sendo o último seguido pelo teste T não pareado com correção de Welch ou pelo teste T não pareado. Diferenças que apresentaram $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

No caso dos microRNAs, é importante ressaltar que as análises estatísticas foram realizadas para os mesmos indivíduos investigados por meio do método de microarranjos para a confirmação dos resultados de expressão de alguns microRNAs obtidos pela última. Tendo em vista que as predições das interações microRNA-mRNA foram baseadas nos resultados de microarranjos e que para a análise de microRNAs foi incluído um número inferior de indivíduos, para melhor parrear os resultados, uma segunda análise estatística foi realizada para cada microRNA incluindo os indivíduos adicionais investigados nas análises de mRNA, buscando assim confirmar a regulação desses microRNAs de interesse em todos os indivíduos estudados.

5.3. Expressão proteica por western blotting

As bandas obtidas por *western blotting* foram escaneadas e quantificadas utilizando o programa *Gel Pro Analyzer 4* (Media Cybernetic). Este quantifica a densidade dos sinais previamente capturados a partir da membrana contendo as bandas, sendo o parâmetro IOD o utilizado. Após a normalização dos valores IOD da proteína de interesse com os valores da proteína endógena, os valores de *fold change* da proteína de interesse por indivíduo foram calculados, como descrito para os dados de qRT-PCR. Esses valores de *fold change* foram então importados para o GraphPad Prism, versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EUA – www.graphpad.com) para a realização das análises estatísticas e construção dos gráficos, como descrito para os dados de qRT-PCR.

5.4. Ensaio do gene repórter luciferase

Os valores de luminescência da luciferase de vagalume foram normalizados com os valores de luminescência da luciferase de *Renilla*. Os valores normalizados foram então importados para o GraphPad Prism, versão 5.01 para Windows

(GraphPad Software, San Diego, California, EUA – www.graphpad.com) para a realização das análises estatísticas e construção dos gráficos. O teste estatístico T pareado foi utilizado para avaliar as diferenças da atividade da luciferase entre as duas diferentes transfecções: pmirGLO (selvagem) + cópula de interesse (hsa-miR-148a – MIMAT0000243) e pmirGLO (mutado) + cópula de interesse (hsa-miR-148a – MIMAT0000243). Diferenças que apresentaram $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Expressão de microRNAs em pacientes DM1 avaliada pelo método de microarranjos

6.1.1. Normalização, ajuste dos dados, análise estatística e geração das curvas ROC

Após a realização do método de microarranjos e a quantificação pelo *software* FE dos dados de expressão dos microRNAs obtidos para as lâminas hibridadas, procedeu-se à análise dos mesmos. Foram realizadas a detecção e a remoção de três amostras *outliers* (correspondentes aos pacientes DM1_05, DM1_12 e DM1_15) e em seguida, as etapas de correção do *background* e normalização pelo método quantile, sendo a última feita com os dados de todos os indivíduos estudados (11 pacientes e nove controles). Os gráficos em formato *boxplot* apresentando os dados pré- e pós-normalização encontram-se em anexo – **ANEXO D** e **ANEXO E**, respectivamente.

Subsequentemente, a análise estatística *rank products* foi aplicada aos dados normalizados para a comparação dos perfis de expressão de microRNAs das PBMCs de pacientes DM1 e de indivíduos saudáveis. A análise *rank products* apontou um total de 146 sondas diferencialmente expressas ($p < 0,01$ e PFP $< 0,05$) em pacientes DM1. Dentre essas sondas, 57, correspondentes a 44 microRNAs distintos (35 induzidos e nove reprimidos), apresentaram valores de AUC $\geq 0,90$ (variando entre 0,90 e 1,00). Os valores de *fold change*, p , PFP e AUC para cada um desses 44 microRNAs podem ser observados na **Tabela 3**. Em seguida, os resultados foram visualizados por meio do agrupamento hierárquico utilizando-se os valores de expressão normalizados desses microRNAs. Foi possível observar o poder discriminatório apresentado por esses 44 microRNAs, evidenciado pelo agrupamento distinto entre os pacientes com DM1 e o grupo controle (**Figura 3**).

Tabela 3. MicroRNAs diferencialmente expressos que apresentaram valores de AUC $\geq 0,90$ em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle (Takahashi et al. 2014).

ID sonda Agilent	ID miRBase	MicroRNA	Fold change	Valor de p	PFP	AUC
A_25_P00013755	MIMAT0003423	ebv-miR-BART12	1,63	0,0E+00	5,0E-04	0,92
A_25_P00010089	MIMAT0000067	hsa-let-7f	1,82	0,0E+00	1,0E-04	0,98
A_25_P00012141	MIMAT0000414	hsa-let-7g	1,56	1,0E-04	2,9E-03	0,91
A_25_P00012038	MIMAT0000099	hsa-miR-101	1,91	0,0E+00	5,0E-05	0,94
A_25_P00010470	MIMAT0000253	hsa-miR-10a	1,54	1,0E-04	4,3E-03	0,93
A_25_P00012215	MIMAT0000445	hsa-miR-126	2,04	0,0E+00	0,0E+00	0,97
A_25_P00012216	MIMAT0000445	hsa-miR-126	1,76	0,0E+00	1,0E-04	0,95
A_25_P00010600	MIMAT0000444	hsa-miR-126*	3,36	0,0E+00	0,0E+00	0,94
A_25_P00014590	MIMAT0000444	hsa-miR-126*	2,70	0,0E+00	0,0E+00	0,92
A_25_P00015210	MIMAT0005929	hsa-miR-1275	0,61	0,0E+00	1,6E-03	0,97
A_25_P00012177	MIMAT0004597	hsa-miR-140-3p	0,63	0,0E+00	3,4E-03	0,98
A_25_P00010131	MIMAT0000243	hsa-miR-148a	1,60	1,0E-04	3,5E-03	0,91
A_25_P00010134	MIMAT0000759	hsa-miR-148b	2,01	0,0E+00	0,0E+00	0,96
A_25_P00013371	MIMAT0004586	hsa-miR-15b*	1,61	0,0E+00	1,3E-03	1,00
A_25_P00010599	MIMAT0000069	hsa-miR-16	1,50	2,0E-04	7,4E-03	0,97
A_25_P00012242	MIMAT0000456	hsa-miR-186	1,65	0,0E+00	4,0E-04	0,92
A_25_P00012431	MIMAT0001412	hsa-miR-18b	1,54	1,0E-04	4,5E-03	0,98
A_25_P00010769	MIMAT0000461	hsa-miR-195	2,16	0,0E+00	0,0E+00	0,96
A_25_P00012063	MIMAT0000232	hsa-miR-199a-3p	1,80	0,0E+00	2,0E-04	0,90
A_25_P00010998	MIMAT0000073	hsa-miR-19a	1,58	1,5E-04	4,6E-03	0,96
A_25_P00013170	MIMAT0004493	hsa-miR-20a*	1,51	1,0E-04	4,6E-03	0,98
A_25_P00013171	MIMAT0004493	hsa-miR-20a*	1,62	1,0E-04	3,1E-03	0,97
A_25_P00010615	MIMAT0001413	hsa-miR-20b	1,67	0,0E+00	1,0E-04	0,96
A_25_P00010975	MIMAT0000076	hsa-miR-21	3,46	0,0E+00	0,0E+00	0,99
A_25_P00010976	MIMAT0000076	hsa-miR-21	3,52	0,0E+00	0,0E+00	0,97
A_25_P00012001	MIMAT0000083	hsa-miR-26b	2,21	0,0E+00	0,0E+00	0,96
A_25_P00012002	MIMAT0000083	hsa-miR-26b	2,04	0,0E+00	0,0E+00	0,97
A_25_P00010761	MIMAT0000419	hsa-miR-27b	1,82	0,0E+00	1,0E-04	0,93
A_25_P00014837	MIMAT0000419	hsa-miR-27b	1,75	0,0E+00	2,5E-04	0,94
A_25_P00013973	MIMAT0000688	hsa-miR-301a	1,93	0,0E+00	1,0E-04	0,97
A_25_P00014610	MIMAT0000693	hsa-miR-30e*	1,79	0,0E+00	1,0E-04	1,00
A_25_P00014611	MIMAT0000693	hsa-miR-30e*	1,64	5,0E-05	2,0E-03	0,96
A_25_P00012021	MIMAT0000090	hsa-miR-32	2,03	0,0E+00	0,0E+00	0,94
A_25_P00012022	MIMAT0000090	hsa-miR-32	2,11	0,0E+00	0,0E+00	0,94
A_25_P00012023	MIMAT0000090	hsa-miR-32	2,20	0,0E+00	0,0E+00	0,92
A_25_P00010153	MIMAT0000761	hsa-miR-324-5p	0,56	0,0E+00	0,0E+00	0,92
A_25_P00010214	MIMAT0000765	hsa-miR-335	1,81	0,0E+00	0,0E+00	0,92
A_25_P00012395	MIMAT0000763	hsa-miR-338-3p	2,05	0,0E+00	0,0E+00	0,96
A_25_P00012026	MIMAT0000091	hsa-miR-33a	1,50	3,0E-04	9,1E-03	0,98
A_25_P00013545	MIMAT0000750	hsa-miR-340*	1,61	1,0E-04	2,9E-03	0,98

continua

continuação

A_25_P00012358	MIMAT0000753	hsa-miR-342-3p	0,57	0,0E+00	7,0E-04	0,98
A_25_P00012354	MIMAT0004694	hsa-miR-342-5p	0,68	1,0E-04	7,2E-03	0,94
A_25_P00012419	MIMAT0004748	hsa-miR-423-5p	0,55	0,0E+00	7,0E-04	0,97
A_25_P00011109	MIMAT0001341	hsa-miR-424	2,37	0,0E+00	0,0E+00	0,97
A_25_P00011110	MIMAT0001341	hsa-miR-424	2,30	0,0E+00	0,0E+00	0,99
A_25_P00012436	MIMAT0001545	hsa-miR-450a	1,49	5,0E-05	1,8E-03	0,98
A_25_P00012437	MIMAT0001545	hsa-miR-450a	1,57	0,0E+00	4,0E-04	0,96
A_25_P00012870	MIMAT0003885	hsa-miR-454	1,64	0,0E+00	6,0E-04	0,99
A_25_P00012871	MIMAT0003885	hsa-miR-454	1,87	0,0E+00	1,0E-04	0,93
A_25_P00014904	MIMAT0003389	hsa-miR-542-3p	1,49	1,5E-04	5,5E-03	1,00
A_25_P00010743	MIMAT0003285	hsa-miR-548c-3p	1,64	0,0E+00	2,0E-04	0,93
A_25_P00012077	MIMAT0000252	hsa-miR-7	1,54	1,0E-04	4,6E-03	0,96
A_25_P00015265	MIMAT0005954	hsa-miR-720	0,56	0,0E+00	1,6E-03	0,91
A_25_P00011964	MIMAT0003888	hsa-miR-766	0,66	1,0E-04	5,7E-03	0,93
A_25_P00011965	MIMAT0003888	hsa-miR-766	0,64	5,0E-05	3,6E-03	0,94
A_25_P00013090	MIMAT0004983	hsa-miR-940	0,62	0,0E+00	3,2E-03	0,96
A_25_P00010048	MIMAT0000096	hsa-miR-98	1,95	0,0E+00	0,0E+00	0,98

ID, identificação; PFP, porcentagem de falsos-positivos; AUC, área sob a curva. Os IDs e os nomes dos microRNAs estão de acordo com o miRBase *release* 12.0, da mesma forma que para as lâminas de microarranjos de microRNAs.

Figura 3. Padrão de expressão e dendrograma das 57 sondas diferencialmente expressas ($p < 0,01$, PFP $< 0,05$) que apresentaram valor de AUC $\geq 0,90$ (correspondentes a 44 microRNAs únicos) em PBMCs de pacientes DM1 quando comparados ao grupo controle. Os microRNAs foram agrupados utilizando a distância de Pearson não centralizada com ligação média. Cada coluna representa uma amostra e cada linha representa um microRNA. Os níveis de expressão dos microRNAs induzidos estão representados em vermelho e os níveis de expressão dos reprimidos encontram-se em verde, sendo que maiores intensidades de cor indicam diferenças de expressão maiores. Ausência de diferença nos níveis de expressão está representada em preto. PFP, porcentagem de falsos-positivos; AUC, área sob a curva (Takahashi et al. 2014).

6.1.2. Predição dos alvos e análise de anotação funcional

Os 44 microRNAs com expressão significativa e que apresentaram valores de $AUC \geq 0,90$ foram submetidos à ferramenta miRWalk, sendo que dos nove programas de predição de alvos incluídos no miRWalk, somente alvos preditos por pelo menos cinco deles foram considerados. Assim, foram identificados 10.827 e 6.636 possíveis alvos dos microRNAs induzidos e reprimidos, respectivamente, em pacientes com DM1 em comparação aos controles.

Em seguida, as duas listas dos possíveis alvos foram submetidas à análise de anotação funcional usando as vias KEGG. Após a remoção de termos redundantes, nossos resultados apontaram um total de 22 e 12 vias KEGG para os alvos dos microRNAs induzidos e reprimidos, respectivamente (**Figura 4A e B**, respectivamente). Os microRNAs diferencialmente expressos associados com cada via KEGG encontram-se no **ANEXO F**. Curiosamente, essa análise funcional apontou várias vias enriquecidas compartilhadas por ambos os microRNAs induzidos e reprimidos: orientação de axônio, endocitose, melanogênese, vias de sinalização da insulina e de quimiocinas e, ainda, câncer, incluindo vias de sinalização de p53 e Wnt, apoptose e adesão focal.

No que diz respeito às vias potencialmente reguladas somente pelos microRNAs induzidos encontraram-se vias de sinalização do receptor de células T, GnRH (do inglês, *gonadotropin-releasing hormone*), cálcio e neurotrofina, potencialização a longo prazo, sinalização celular epitelial em infecção por *Helicobacter pylori*, esclerose lateral amiotrófica (ELA), junção *gap* e várias vias relacionadas ao câncer (regulação do citoesqueleto de actina e as vias de sinalização de TGF- β , Hedgehog e MAPK). Em relação às vias que são potencialmente e exclusivamente controladas pelos microRNAs reprimidos encontraram-se apenas duas: junção aderente e via de sinalização de Notch.

A análise de anotação funcional apontou várias vias associadas ao câncer. Portanto, a lista dos 44 microRNAs diferencialmente expressos com valores de $AUC \geq 0,90$ (resultados do presente trabalho) foi comparada com uma lista de 52 microRNAs que foram encontrados diferencialmente expressos em duas linhagens humanas tumorais quando comparadas com PBMCs normais (Vaz et al. 2010). Nossos resultados apontaram que 12 dos 44 microRNAs diferencialmente expressos

detectados no presente trabalho também foram identificados por Vaz et al. (2010) como diferencialmente expressos nas duas linhagens tumorais (**Tabela 4**). Quatro microRNAs apresentaram a mesma regulação em ambos os estudos, sendo dois induzidos (hsa-miR-98 e hsa-miR-199a-3p) e dois reprimidos (hsa-miR-342-3p e hsa-miR-324-5p). É importante ressaltar que de acordo com os nossos resultados, dentre os 12 microRNAs compartilhados, nove dos 10 induzidos estão incluídos dentre os que possivelmente controlam três vias implicadas em câncer: as vias de sinalização de TGF- β , Hedgehog e Wnt (**ANEXO F**). Já os 10 microRNAs induzidos estão dentre os que potencialmente controlam seis vias relacionadas ao câncer: vias em câncer, vias de sinalização de p53 e MAPK, apoptose, adesão focal e regulação do citoesqueleto de actina. Além disso, de forma semelhante, dentre os 12 microRNAs, os dois reprimidos se encontram dentre os que potencialmente regulam seis vias envolvidas em câncer: vias em câncer, vias de sinalização de p53 e Wnt, apoptose, adesão focal e junção aderente (**ANEXO F**).

A

Figura 4. Vias apontadas pela análise funcional como enriquecidas considerando os potenciais alvos dos microRNAs diferencialmente expressos (que apresentaram valores de AUC $\geq 0,90$), induzidos (**A**) e reprimidos (**B**) em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle. Os escores de enriquecimento obtidos pelo banco de dados DAVID correspondentes a cada via KEGG estão apresentados como os valores de p em escala logarítmica ($-\log$) (Takahashi et al. 2014).

Tabela 4. MicroRNAs diferencialmente expressos com valores de AUC $\geq 0,90$ em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle (presente trabalho) encontrados diferencialmente expressos em duas linhagens humanas tumorais em relação a PBMCs normais (Vaz et al. 2010) e a regulação dos mesmos em cada trabalho.

MicroRNAs	Regulação no presente estudo	Regulação no estudo de Vaz et al.
hsa-let-7g	Induzido	Reprimido
hsa-miR-101	Induzido	Reprimido
hsa-miR-126	Induzido	Reprimido
hsa-miR-16	Induzido	Reprimido
hsa-miR-186	Induzido	Reprimido
hsa-miR-199a-3p	Induzido	Induzido
hsa-miR-21	Induzido	Reprimido
hsa-miR-27b	Induzido	Reprimido
hsa-miR-7	Induzido	Reprimido
hsa-miR-98	Induzido	Induzido
hsa-miR-324-5p	Reprimido	Reprimido
hsa-miR-342-3p	Reprimido	Reprimido

AUC, área sob a curva; PBMCs, células mononucleares do sangue periférico.

6.2. Expressão de mRNAs em pacientes DM1 avaliada pelo método de microarranjos

6.2.1. Normalização, ajuste dos dados, análise estatística e priorização gênica

Após a realização do método de microarranjos e a quantificação pelo *software* FE dos dados de expressão dos mRNAs obtidos para as lâminas hibridadas, procedeu-se à análise dos mesmos. O *background* foi subtraído e a normalização foi realizada com os dados de todos os indivíduos estudados (19 pacientes e 11 controles) por meio do método quantile. Os gráficos em formato *boxplot* apresentando os dados pré- e pós-normalização encontram-se em anexo – **ANEXO G** e **ANEXO H**, respectivamente. Em seguida, os dados normalizados foram ajustados pelo método Bayes empírico, o qual eficientemente removeu os artefatos experimentais, visto que no gráfico da PCA, foi possível notar a proximidade entre às amostras DM1_07 e DM1_07_2 (**ANEXO I**), os quais correspondem à mesma amostra de RNA, porém marcada e hibridada em experimentos diferentes. Adicionalmente, o mesmo foi observado para as amostras DM1_18, DM1_18_2 e DM1_18_3, as quais correspondem à mesma amostra de RNA, porém marcada e

hibridada em experimentos distintos (**ANEXO I**). Para a detecção de amostras *outliers*, o método IAC foi realizado como descrito para microRNAs, sendo que não foi necessário excluir nenhuma amostra.

Subsequentemente, a análise estatística *rank products* foi aplicada aos dados. É importante ressaltar que todas as réplicas técnicas foram utilizadas para normalização e ajuste dos dados, porém, para evitar redundância, apenas uma das réplicas foi utilizada na análise estatística (DM1_07 e DM1_18), sendo que os dados de expressão das outras (DM1_07_2, DM1_18_2 e DM1_18_3) foram removidos antes da aplicação do teste estatístico. A análise *rank products* apontou um total de 277 genes diferencialmente expressos em PBMCS de pacientes DM1 relativamente aos controles (220 induzidos e 57 reprimidos). Dentre esses, alguns já foram amplamente relacionados ao DM1 na literatura, visto que estão implicados em eventos moleculares e celulares envolvidos no desenvolvimento da doença, incluindo os associados com processos inflamatórios, destacando-se dois genes incluídos no grupo dos 76 genes candidatos ao DM1 previamente relatados (segundo o banco de dados T1Dbase): *HLA-DQB1* e *CD69* (**Tabela 5**). A lista total dos genes diferencialmente expressos, valores de *p*, PFP e *fold change* encontram-se no **ANEXO J**.

Além disso, com o intuito de identificar genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA, a lista de genes diferencialmente expressos foi submetida à ferramenta de priorização gênica Endeavour. Esta possibilitou a integração de todas as informações disponíveis em vários bancos de dados sobre os genes pertencentes aos processos biológicos “resposta ao estresse oxidativo” (GO:0006979) e “reparo do DNA” (GO:0006281), seguido do ranqueamento dos genes diferencialmente expressos com base na similaridade dos últimos com os genes das duas GOs de interesse. Os 16 genes que se mostraram melhor ranqueados em cada processo juntamente com os respectivos valores de *fold change* estão destacados na **Tabela 6**.

Tabela 5. Lista de genes diferencialmente expressos em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle, os quais já foram amplamente relacionados ao DM1 na literatura.

Símbolos	Nomes dos genes	Funções*	Fold change	PFP	Valor de p
<i>ATF3</i>	<i>activating transcription factor 3</i>	regulação da transcrição	1,40	3,40E-03	5,00E-05
<i>BCL2A1</i>	<i>BCL2-related protein A1</i>	anti-apoptose	1,27	3,00E-04	0,00E+00
<i>CCL20</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 20</i>	respostas imune e inflamatória, quimiotaxia	1,70	7,00E-04	0,00E+00
<i>CD69</i>	<i>CD69 molecule</i>	proliferação de linfócitos, receptor de transmissão de sinais	1,14	3,16E-02	4,00E-04
<i>CXCL2</i>	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 2</i>	respostas imune e inflamatória, quimiotaxia	2,22	0,00E+00	0,00E+00
<i>DUSP2</i>	<i>dual specificity phosphatase 2</i>	inativação da atividade de MAPK, regulação do processo apoptótico	1,38	0,00E+00	0,00E+00
<i>GZMB</i>	<i>granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)</i>	citólise, proteólise, processo apoptótico	1,22	5,40E-03	0,00E+00
<i>GZMH</i>	<i>granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)</i>	citólise, proteólise, processo apoptótico	1,16	1,60E-03	0,00E+00
<i>HLA-DQB1</i>	<i>major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1</i>	resposta imune, regulação positiva do processamento e apresentação de antígenos	0,90	5,80E-03	5,00E-05
<i>IFNG</i>	<i>interferon, gamma</i>	resposta imune humoral e adaptativa, resposta a proteínas incorretamente dobradas do retículo endoplasmático, processo apoptótico	1,17	2,87E-02	3,00E-04
<i>IL1B</i>	<i>interleukin 1, beta</i>	resposta imune e inflamatória, processo apoptótico, regulação positiva da proliferação de células T	2,60	0,00E+00	0,00E+00
<i>IL6</i>	<i>interleukin 6 (interferon, beta 2)</i>	resposta imune humoral, regulação da proliferação celular	1,37	4,00E-04	0,00E+00
<i>PTGS2</i>	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)</i>	regulação do ciclo celular, resposta ao estímulo de citocinas e ao estresse oxidativo, processo biossintético de prostaglandinas	1,57	0,00E+00	0,00E+00
<i>PTX3</i>	<i>pentraxin 3, long</i>	resposta inflamatória, regulação positiva da fagocitose e do processo biossintético de óxido nítrico	1,62	0,00E+00	0,00E+00
<i>TNF</i>	<i>tumor necrosis factor</i>	resposta imune humoral e inflamatória, ativação da atividade de MAPK	2,30	2,21E-02	5,00E-05
<i>TNFAIP3</i>	<i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>	anti-apoptose, regulação negativa da atividade do fator de transcrição NF-kappaB, da produção de TNF e da resposta inflamatória	1,44	0,00E+00	0,00E+00

*As funções de todos os genes foram obtidas pela ferramenta SOURCE (2000) (<http://puma.princeton.edu/cgi-bin/source/sourceResult>). PFP, porcentagem de falsos-positivos.

Tabela 6. Genes diferencialmente expressos em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle (com os respectivos valores de *fold change*) que apresentaram maior similaridade com genes pertencentes aos termos GO “resposta ao estresse oxidativo” e “reparo do DNA” segundo a análise pela ferramenta Endeavour.

Ranqueamento	Resposta ao estresse oxidativo	Nome do gene	Fold change	Reparo do DNA	Nome do Gene	Fold Change
1	DUSP1	dual specificity phosphatase 1	1,43	GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	1,25
2	UCP3	uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)	0,81	JUNB	jun B proto-oncogene	1,15
3	PFKL	phosphofructokinase, liver	1,14	PFKL	phosphofructokinase, liver	1,14
4	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	1,57	ATF3	activating transcription factor 3	1,40
5	PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	1,15	FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	1,43
6	CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	1,75	PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	1,15
7	CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2	0,80	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	1,12
8	LTF	lactotransferrin	0,97	DDX3Y	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 3, Y-linked	1,19
9	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	1,18	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	1,16
10	MYOM2	myomesin 2	0,87	PPP1R15A	protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A	1,49
11	LPL	lipoprotein lipase	1,31	DUSP1	dual specificity phosphatase 1	1,43
12	DSP	desmoplakin	1,10	TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	1,44
13	CES1	carboxylesterase 1	0,84	MAPK8IP1	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1	0,89
14	PPP1R15A	protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A	1,49	NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	1,58
15	TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	1,44	LPL	lipoprotein lipase	1,31
16	HP	haptoglobin	1,12	DDX43	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 43	1,09

6.2.2. Análise de grupos gênicos (GSA e GSEA)

Visto que na análise de genes individuais alguns deles podem não apresentar expressão significativa entre os grupos comparados (DM1 *versus* controle), mas em conjunto, podem contribuir para que uma determinada via seja diferencialmente expressa, bem como enriquecida, duas análises foram realizadas: GSA e GSEA por meio do *BRB-ArrayTools*. Foi investigado um total de 5.031 grupos gênicos (GOs), sendo encontrados 49 grupos significativamente expressos selecionados pelo teste GSA Efron-Tibshirani ($p < 0,005$) e 55 grupos gênicos estatisticamente enriquecidos por meio dos testes permutativos LS/KS ($p < 0,005$). Dentre esses grupos gênicos, alguns processos biológicos se mostraram interessantes para o presente estudo: via de sinalização apoptótica, encontrada estatisticamente induzida em DM1 e resposta ao hidroperóxido, reparo de quebras de fita dupla via recombinação homóloga/reparo de recombinação e resposta ao estresse do retículo endoplasmático, encontrados estatisticamente enriquecidos em DM1 (**Tabela 7**). O conjunto de todos os grupos gênicos significativos apontados nas duas análises é mostrado no **ANEXO K**.

Tabela 7. Processos biológicos de interesse observados como diferencialmente expressos/enriquecidos em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle.

GO	Descrição da GO	Número de genes	Valor de p
GO:0097190	via de sinalização apoptótica	68	< 0,001 (+)
GO:0033194	resposta ao hidroperóxido	7	0,00145 (KS)
GO:0000724	reparo de quebras de fita dupla via recombinação homóloga	42	0,00475 (KS)
GO:0000725	reparo de recombinação	42	0,00475 (KS)
GO:0034976	resposta ao estresse do retículo endoplasmático	88	0,00189 (LS)

6.3. Comparação dos resultados de expressão de microRNAs e mRNAs

Para verificar se dentre os genes diferencialmente expressos estavam incluídos possíveis alvos dos microRNAs que também apresentaram expressão

diferenciada em pacientes DM1 em relação ao grupo controle, a ferramenta VENNY foi utilizada. Foram comparadas a lista dos alvos preditos dos 44 microRNAs significativamente expressos (e que apresentaram valores de AUC $\geq 0,90$) e a lista dos genes diferencialmente expressos. Nossos resultados indicaram que 144 (52%) dos 277 genes diferencialmente expressos são potencialmente regulados pelos microRNAs diferencialmente expressos, sendo que 75 são possivelmente regulados somente pelos microRNAs induzidos, sete somente pelos microRNAs reprimidos e 62 tanto pelos induzidos quanto pelos reprimidos. É importante ressaltar que dentre esses genes encontraram-se dois candidatos ao DM1 (*HLA-DQB1* e *CD69*), assim como genes envolvidos em eventos moleculares e celulares que já foram amplamente relacionados ao DM1 na literatura, incluindo os associados com processos inflamatórios (*IL1B*, *IFNG*, *IL6*, *PTX3*, *CCL20*, *CXCL2* e *DUSP2*). A lista de todos os genes diferencialmente expressos e dos microRNAs que potencialmente os regulam encontra-se no **ANEXO L**.

Dentre os 144 potenciais alvos dos microRNAs diferencialmente expressos, um maior enfoque foi dado aos genes associados aos processos biológicos “resposta ao estresse oxidativo” e “reparo do DNA”, apontados pela ferramenta Endeavour (**Tabela 8**). Nossos resultados indicaram nove e 13 genes pertencentes aos dois processos biológicos de interesse (resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA, respectivamente) que são potenciais alvos dos microRNAs diferencialmente expressos, com quatro genes sendo compartilhados entre os dois processos (*DUSP1*, *PDGFRB*, *LPL* e *TNFAIP3*).

Tabela 8. Interações microRNA-mRNA diferencialmente expressos em PBMCs de pacientes DM1 comparados aos controles.

Genes	microRNAs
<i>DUSP1</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-32; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b
<i>UCP3</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-454; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-324-5p
<i>PTGS2</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-33a; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-548c-3p
<i>PDGFRB</i>	hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766
<i>CCL4</i>	hsa-miR-542-3p
<i>CCL2</i>	hsa-miR-33a; hsa-miR-335
<i>LPL</i>	hsa-miR-27b; hsa-miR-32; hsa-miR-342-3p
<i>DSP</i>	hsa-miR-186; hsa-miR-548c-3p
<i>TNFAIP3</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-21; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-186; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-423-5p
<i>GADD45B</i>	hsa-miR-454; hsa-miR-301a
<i>JUNB</i>	hsa-miR-101; hsa-miR-338-3p
<i>ATF3</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-195; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-342-3p
<i>FOSB</i>	hsa-miR-27b; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>FOS</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-101; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-338-3p
<i>CDKN1C</i>	hsa-miR-32
<i>MAPK8IP1</i>	hsa-miR-10a; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-940
<i>DDX43</i>	hsa-miR-548c-3p
<i>NFKBIA</i>	hsa-miR-140-3p

6.4. Expressão de microRNAs avaliada por qRT-PCR

O método de qRT-PCR foi realizado para a confirmação dos resultados de expressão obtidos para alguns microRNAs de interesse (hsa-miR-101, hsa-miR148a, hsa-miR-27b e hsa-miR-424) pelo método de microarranjos de microRNAs. Todos os microRNAs selecionados se mostraram significativamente induzidos em pacientes DM1 em relação aos controles (**Figura 5A-D**). Deste modo, os resultados de expressão dos microRNAs selecionados obtidos pelos métodos de microarranjos e qRT-PCR foram semelhantes (**Figura 6**).

Figura 5. Expressão relativa dos microRNAs, avaliada por qRT-PCR, cujos alvos preditos estão associados aos processos de resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle. Para todos os microRNAs, o ensaio foi realizado para 11 amostras de pacientes DM1 e para nove amostras de indivíduos saudáveis não diabéticos, sendo tais amostras as mesmas utilizadas para o método de microarranjos de microRNAs. Os valores de expressão dos microRNAs de interesse foram normalizados com os valores de expressão do gene endógeno RNU48. Para o microRNA hsa-miR-101 (A) utilizou-se o teste T não pareado com correção de Welch, sendo que para os microRNAs hsa-miR-148a (B), hsa-miR-27b (C) e hsa-miR-424 (D) o teste T não pareado foi utilizado. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão. ** indica valores estatisticamente significativos para $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 6. Comparação dos valores de *fold change* (grupo de pacientes DM1 *versus* grupo controle), obtidos pelos métodos de microarranjos e qRT-PCR, para os microRNAs diferencialmente expressos selecionados. As mesmas amostras (11 pacientes DM1 e nove controles) foram utilizadas para ambos os métodos.

Visando um melhor pareamento dos resultados das predições relativas às interações microRNA-mRNA, uma segunda análise estatística foi realizada para cada um dos quatro microRNAs selecionados. Nesta análise, foram incluídos os indivíduos adicionais investigados nas análises de microarranjos de mRNA, para assim confirmar a regulação desses microRNAs de interesse para todos os indivíduos estudados. As diferenças significativas observadas entre pacientes DM1 e controles se mantiveram para os quatro microRNAs e os resultados globais dessa segunda análise encontram-se em anexo – **ANEXO M** e **ANEXO N**.

6.5. Expressão de mRNAs avaliada por qRT-PCR

O método de qRT-PCR foi realizado para a confirmação dos resultados de expressão obtidos para alguns genes de interesse (*UCP3*, *PTGS2*, *ATF3*, *FOSB*, *DUSP1* e *TNFAIP3*) pelo método de microarranjos de mRNAs. Com exceção de *UCP3*, o qual manteve a mesma tendência de repressão, mas sem apresentar diferença estatisticamente significativa, todos os outros cinco genes mostraram-se significativamente induzidos em pacientes DM1 quando comparados ao grupo controle (**Figura 7A-F**). Deste modo, os resultados de expressão dos seis genes selecionados obtidos pelos métodos de microarranjos qRT-PCR foram semelhantes (**Figura 8**).

Figura 7. Expressão relativa de genes associados aos processos de resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle avaliada por qRT-PCR. Para todos os genes, o ensaio foi realizado para as 19 amostras de pacientes DM1, sendo que para os genes *UCP3* (A), *PTGS2* (B), *ATF3* (C), *DUSP1* (E) e *TNFAIP3* (F), o ensaio foi realizado para 10 amostras de indivíduos saudáveis não diabéticos (exceto Co_11) e para o gene *FOSB* (D), dois controles foram excluídos (Co_01 e Co_11). Essas amostras foram as mesmas utilizadas para o método de microarranjos. Os valores de expressão dos genes de interesse foram normalizados com os valores de expressão dos dois genes endógenos *GAPDH* e *HPRT1*. Para o gene *TNFAIP3* (F) o teste T não pareado com correção de Welch foi utilizado e as barras representam a média $\pm$ desvio padrão. Para os genes *UCP3* (A), *PTGS2* (B), *ATF3* (C), *FOSB* (D) e *DUSP1* (E), o teste Mann-Whitney foi utilizado e as barras representam a mediana e o intervalo interquartil. * indica valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns, não significativo.

Figura 8. Comparação dos valores de *fold change* (grupo de pacientes DM1 *versus* grupo controle), obtidos pelos métodos de microarranjos e qRT-PCR, para os genes diferencialmente expressos selecionados.

6.6. Expressão das proteínas PTGS2, ATF3 e DUSP1 avaliada por western blotting

Com base nos resultados de expressão de mRNAs em pacientes DM1 quando comparados ao grupo controle pelos métodos de microarranjos e qRT-PCR, três genes foram selecionados para a avaliação da expressão das respectivas proteínas por *western blotting*. As proteínas PTGS2 e ATF3 não apresentaram níveis de expressão detectáveis em nenhum dos dois grupos estudados, com exceção de uma única amostra de paciente para ATF3 (~21 kDa) (**Figura 9A e B**, respectivamente). Já a proteína DUSP1 apresentou níveis de expressão detectáveis, tanto para pacientes como para o grupo controle, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos (**Figura 9C e D**). Portanto, esses dados de expressão proteica não são condizentes com os dados de expressão dos respectivos mRNAs, os quais se mostraram induzidos no grupo de pacientes. Assim, os resultados obtidos por *western blotting* sugerem a possibilidade dos microRNAs induzidos que foram preditos como potenciais reguladores de PTGS2, ATF3 e DUSP1 estarem atuando na repressão da tradução dessas três proteínas. Os oito

microRNAs induzidos preditos como reguladores de PTGS2 foram hsa-miR-7, hsa-miR-26b, hsa-miR-33a, hsa-miR-101, hsa-miR-148a, hsa-miR-148b, hsa-miR-542-3p e hsa-miR-548c-3p; os sete microRNAs induzidos preditos para DUSP1 foram hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-32; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a e hsa-miR-148b; e os sete microRNAs induzidos preditos como reguladores de ATF3 foram hsa-miR-7, hsa-miR-16, hsa-miR-27b, hsa-miR-195, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-542-3p e hsa-miR-424 (**Tabela 8**).

Figura 9. Expressão proteica avaliada por *western blotting* em PBMCs de pacientes DM1 e indivíduos sadios não diabéticos. A análise foi realizada utilizando anticorpos para as seguintes proteínas: PTGS2 (~72 kDa) (**A**), ATF3 (~21/35 kDa) (**B**) e DUSP1 (~40 kDa) (**C**). Para DUSP1, as bandas foram quantificadas e análise estatística realizada (**D**). Os anticorpos para as proteínas β-actina (~42 kDa) e β-tubulina (~55 kDa) foram utilizados como controles endógenos. Extratos das linhagens celulares humanas HeLa e U87 foram usados como controles positivos (C+): para PTGS2 foi utilizada U87; para DUSP1, HeLa; para ATF3 ambas as linhagens (U87 na primeira coluna e HeLa na segunda).

6.7. Interações microRNA-alvo avaliadas pelo ensaio do gene repórter luciferase

Para verificar a possibilidade de ocorrência, em meio celular, de duas das interações microRNA-alvo previstas, o ensaio do gene repórter luciferase foi realizado. As interações mais favoráveis entre o microRNA hsa-miR-148a (MIMAT0000243) e sítios localizado nas regiões 3' UTR de *DUSP1* e *PTGS2* foram selecionadas por meio da ferramenta RNAhybrid (**Figura 10A e B**, respectivamente).

Figura 10. Interações microRNA-mRNA mais favoráveis previstas pela ferramenta RNAhybrid. A sequência superior corresponde ao sítio de ligação do microRNA presente na região 3' UTR do mRNA de *DUSP1* (**A**) ou *PTGS2* (**B**); a sequência inferior corresponde ao microRNA complementar hsa-miR-148a. mfe, energia livre mínima de ligação.

Após a co-transfecção do plasmídeo pmirGLO-selvagem ou pmirGLO-mutado e o mímico de interesse (hsa-miR-148a), nossos resultados indicaram a ocorrência de interação específica entre hsa-miR-148a e uma porção da 3' UTR de *DUSP1* contendo o sítio de ligação predito para esse microRNA em meio celular. Isso deve-se ao fato de que foi possível observar que a atividade relativa da luciferase foi significativamente reduzida em relação ao controle, no qual mutações foram introduzidas na mesma região com o intuito de desfavorecer a interação

(Figura 11A). Portanto, tendo em vista esses resultados, juntamente com os obtidos por *western blotting*, existe a possibilidade de que hsa-miR-148a possa contribuir para a repressão da tradução de *DUSP1*. Por outro lado, nossos resultados não apontaram interação específica entre hsa-miR-148a e uma porção da 3' UTR de *PTGS2* contendo o sítio de ligação predito para esse microRNA, já que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à mesma região mutada (Figura 11B).

Figura 11. Avaliação das interações preditas hsa-miR-148a/*DUSP1* e hsa-miR-148a/*PTGS2* em meio celular por meio do ensaio do gene repórter luciferase. As construções pmirGLO-*DUSP1*(wt) ou pmirGLO-*DUSP1*(mut) (A), bem como pmirGLO-*PTGS2*(wt) ou pmirGLO-*PTGS2*(mut) (B), foram co-transfectadas com o mímico de interesse (hsa-miR-148a – MIMAT0000243) em células HEK293T. A atividade da luciferase de vagalume foi normalizada com a da luciferase de *Renilla*, sendo ambas avaliadas 36 horas após a transfecção. O teste T pareado foi utilizado e as barras representam a média $\pm$ desvio padrão. wt, sequência selvagem; mut, sequência mutada; * valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$; ns, não significativo.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

7.1. Perfis de expressão de microRNAs em pacientes DM1

A causa exata do DM1 ainda não foi elucidada, o que requer a busca de biomarcadores da doença e possíveis funções destes, as quais poderão auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares associados ao DM1, além de oferecer uma possível aplicação na prática clínica, possibilitando o desenvolvimento de tratamentos que permitam lidar de forma mais apropriada com a doença e até mesmo possibilitar um diagnóstico mais precoce.

Assim, a primeira parte do presente trabalho visou identificar microRNAs diferencialmente expressos, capazes de distinguir pacientes DM1 de indivíduos saudáveis não diabéticos. Para tal, foi realizado o método de microarranjos, o qual possibilitou a comparação dos níveis de expressão de microRNAs apresentados pelas PBMCs provenientes de pacientes DM1 e de indivíduos saudáveis não diabéticos.

No presente estudo, foi identificado um grupo de 44 microRNAs distintos com grande especificidade, o qual claramente estratificou pacientes DM1 do grupo controle, sendo que a expressão de quatro deles foi confirmada pelo método de qRT-PCR (hsa-miR-101, hsa-miR-148a, hsa-miR-27b e hsa-miR-424). Apenas alguns outros estudos investigaram a expressão de microRNAs em pacientes DM1 comparados a indivíduos saudáveis não diabéticos. Hezova et al. (2010) analisaram os perfis de expressão de microRNAs em células T reguladoras provenientes de adultos que apresentaram a doença de forma crônica. Dentre os microRNAs diferencialmente expressos, hsa-miR-342 (cuja nomenclatura atual é hsa-miR-342-3p) apresentou-se reprimido. Da mesma forma, este último foi encontrado reprimido no presente trabalho com valor de *fold change* de 0,57. Além disso, Nielsen et al. (2012) avaliaram os níveis de expressão dos microRNAs presentes no soro de crianças e adolescentes com DM1 recém-diagnosticados e os resultados indicaram hsa-miR-148a e hsa-miR-27b entre os induzidos, compatível com o presente trabalho, sendo que os valores de *fold change* para hsa-miR-148a foram 1,60 (microarranjos) e 2,54 (qRT-PCR) e para hsa-miR-27b foram 1,82 e 1,75 referentes

às duas sondas correspondentes a este microRNA (microarranjos) e 3,54 (qRT-PCR).

Ainda, hsa-miR-21 se mostrou significativamente reprimido em PBMCs de crianças afetadas pelo DM1 crônico (Salas-Perez et al. 2013). Porém, os resultados relatados para este microRNA em DM1 têm se mostrado contraditórios, pois a expressão deste foi encontrada significativamente induzida em amostras de urina e plasma de crianças e adolescentes com DM1 (Osipova et al. 2014), assim como em PBMCs de pacientes afetados por essa doença no presente estudo (com valores de *fold change* 3,46 e 3,52 referentes às duas sondas correspondentes ao hsa-miR-21).

Em contraste com nossos resultados, hsa-miR-126 foi significativamente reprimido em amostras de urina de crianças e adolescentes com DM1 (Osipova et al. 2014) e, embora tenhamos observado modulação desse microRNA, este se mostrou induzido no presente estudo (valores de *fold change* 2,04 e 1,76 referentes às duas sondas correspondentes ao hsa-miR-126). Todos os outros 39 microRNAs encontrados diferencialmente expressos no nosso trabalho não foram relatados em nenhuma outra publicação na qual a comparação entre pacientes DM1 e indivíduos saudáveis tenha sido realizada até o presente.

Desta forma, além de confirmar os resultados de outros estudos em relação a alguns microRNAs que apresentaram expressão significativamente modulada em pacientes DM1, no presente trabalho, foram identificados novos microRNAs com expressão alterada em DM1 relativamente ao grupo controle. Adicionalmente, é importante observar que dois dos microRNAs diferencialmente expressos (hsa-miR-148a e hsa-miR-27b) em pacientes DM1 crônico (identificados no nosso estudo) foram também detectados em pacientes recém-diagnosticados (Nielsen et al. 2012), sugerindo que esses dois microRNAs podem ser potenciais marcadores com papel regulatório no desenvolvimento do DM1.

Além disso, vias possivelmente reguladas pelos microRNAs diferencialmente expressos foram apontadas. A maioria das vias KEGG foi relacionada ao câncer (incluindo via de sinalização de p53 e apoptose); além destas, outras vias potencialmente controladas pelos microRNAs, tanto induzidos quanto reprimidos, que foram previamente associadas com DM1, foram selecionadas para discussão: adesão focal, endocitose, vias de sinalização da insulina e de quimiocina e orientação de axônio.

Embora não tenha sido definitivamente estabelecida, existem evidências de uma associação entre DM1 e risco aumentado ao desenvolvimento de diversos cânceres. De acordo com um estudo realizado na Suécia, em relação ao restante da população, pacientes DM1 apresentaram um aumento de 20% na incidência de câncer em geral (Zendejdel et al. 2003). No que diz respeito aos tipos específicos de câncer, risco elevado de câncer de boca e faringe, fígado, esôfago, endométrio, colo do útero, estômago, carcinoma de células escamosas da pele e leucemia foi relatado em pacientes DM1 (Wideroff et al. 1997; Zendejdel et al. 2003; Shu et al. 2010). De acordo com essas evidências, foram observados níveis significativamente elevados de danos no DNA (basais e oxidativos) em leucócitos (Hannon-Fletcher et al. 2000; Dincer et al. 2003), assim como concentrações significativamente maiores de 8-OHdG, um marcador de dano oxidativo no DNA, o qual foi analisado na urina (Hata et al. 2006; Goodarzi et al. 2010) e em espermatozoides (Agbaje et al. 2008) de pacientes DM1 em comparação a indivíduos saudáveis, indicando que esses pacientes estão mais suscetíveis a danos no material genético. Ainda, 12 microRNAs foram encontrados diferencialmente expressos tanto no presente estudo quanto no realizado por Vaz et al. (2010), o qual comparou duas linhagens humanas tumorais com PBMCs normais. Esses 12 microRNAs compartilhados por ambos os trabalhos estão dentre os apontados no presente estudo como potenciais reguladores de vias associadas ao câncer.

Adicionalmente, em resposta a sinais de estresse, incluindo danos no DNA, a via de p53 é ativada. TP53 é um fator de transcrição que, sob condições de estresse, ativa vários genes-alvo implicados na reparação do DNA, senescência, bem como no bloqueio do ciclo celular e apoptose (Levine 1997; Riley et al. 2008; Vazquez et al. 2008). Assim, nossos resultados relativos às várias vias relacionadas ao câncer as quais se mostraram possivelmente reguladas por microRNAs (reprimidos e induzidos) em pacientes com DM1 corroboram alguns estudos da literatura que apontam uma associação entre essas duas doenças, havendo a possibilidade de que o aumento de danos ao DNA observado previamente em pacientes DM1 por outros grupos possa contribuir para a incidência de câncer nesses pacientes.

No que diz respeito à via de adesão focal (pontos de contato célula-matriz extracelular), Li et al. (2011) relataram uma redução na migração e adesão das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de camundongos

diabéticos não obesos (NOD, do inglês *nonobese diabetic*), um modelo animal para o estudo do DM1 (Millet et al. 2006). As células-tronco mesenquimais têm o potencial de se diferenciarem em células pancreáticas e das ilhotas, representando assim, uma possível ferramenta para a terapia celular no DM1, sendo que a capacidade migratória e de adesão dessas células poderia atuar no reparo de tecidos *in vivo* (Li et al. 2011). Essa diminuição da migração e adesão das células-tronco mesenquimais de camundongos NOD poderia ser consequência da distribuição irregular da quinase de adesão focal (FAK, do inglês *focal adhesion kinase*) e da actina filamentosa (F-actina) apresentada por essas células (Li et al. 2011). Assim, nosso estudo sugere que a expressão anormal de microRNAs possivelmente pode constituir um dos eventos capazes de levar à interrupção de processos celulares críticos associados ao desenvolvimento do DM1.

Quanto à via de endocitose, Souza et al. (2004) demonstraram a modulação de genes relacionados a esta via em resposta ao tratamento das células produtoras de insulina RINm5F utilizando citocinas pró-inflamatórias, as quais são tóxicas para essas células. Os mesmos autores observaram que os genes que controlam positivamente esta via foram induzidos enquanto que aqueles que a regulam negativamente foram reprimidos, assim, favorecendo a internalização dos receptores de citocinas. A repressão dos receptores de citocinas por meio da internalização dos mesmos pode reduzir os efeitos tóxicos das citocinas sobre as células β ; deste modo, esses resultados indicaram que a modulação de genes relacionados à via de endocitose poderia ser um mecanismo envolvido na proteção das células produtoras de insulina contra a toxicidade mediada por citocinas (Souza et al. 2004). Por conseguinte, a expressão aberrante de microRNAs poderia possivelmente interferir no papel protetor da endocitose.

Em relação à via de sinalização da insulina, a quantidade desse hormônio necessária para atingir o controle glicêmico ideal em pacientes DM1 é muito maior do que a sua concentração fisiológica normal, o que é capaz de provocar hiperinsulinemia iatrogênica; esta é evidenciada pelo fato de que os níveis de insulina na periferia (plasma) foram aproximadamente duas vezes maiores em pacientes do que os observados em indivíduos saudáveis de mesma idade e peso (Wang et al. 2013). Portanto, a hiperinsulinemia iatrogênica acentuada poderia ser uma possível explicação para o fato de que a via de sinalização da insulina se encontrou significativamente enriquecida com os alvos preditos dos microRNAs

diferencialmente expressos, apesar de a produção desse hormônio cessar em pacientes DM1.

Por fim, com relação à via de sinalização de quimiocinas e orientação de axônio, estas têm sido implicadas na biologia celular das células T. Sharp et al. (2008) relataram que a quimiocina SDF-1 (do inglês *stromal cell-derived factor-1*) participa nas respostas de quimiorrepulsão por meio da diminuição da adesão de células T diabetogênicas provenientes de camundongos diabéticos NOD/LtJ, sendo que esse evento é importante para controlar o recrutamento de células autoimunes ao pâncreas (Sharp et al. 2008). Ainda, a associação de SLIT2 (glicoproteína envolvida no desenvolvimento do sistema nervoso) ao seu receptor ROBO1 (do inglês *roundabout, axon guidance receptor 1*) está envolvida neste evento (Glawe et al. 2013). A expressão proteica elevada de ROBO1 em células T de camundongos NOD e de pacientes DM1 foi detectada, o que poderia representar uma resposta implicada na regulação do recrutamento de células T agressivas ao pâncreas (Glawe et al. 2013).

Além do envolvimento da quimiocina SDF-1 na biologia das células T, níveis anormais destas moléculas pró-inflamatórias foram também observados em DM1. Antonelli et al. (2008) observaram níveis significativamente elevados de CXCL10 no soro de crianças durante o diagnóstico do DM1 em relação a parentes de primeiro grau e crianças saudáveis. Portanto, esses resultados indicam que a expressão alterada dos microRNAs poderia estar envolvida tanto na regulação da expressão de quimiocinas em pacientes DM1 como na deficiência no processo de auto-tolerância por meio de moléculas que também participam da via de sinalização de quimiocinas e orientação de axônio.

Nesta primeira parte do presente estudo, a análise bioinformática apontou um conjunto de 44 microRNAs com o potencial de servirem como marcadores moleculares capazes de discriminar pacientes DM1 de indivíduos saudáveis. Dentre esses microRNAs, 39 foram relatados pela primeira vez no presente trabalho. Ainda, nossos resultados corroboram alguns dados da literatura, visto que muitas vias biológicas previamente implicadas em DM1 são possivelmente reguladas por tais microRNAs que apresentaram modulação alterada nos pacientes, incluindo várias vias relacionadas ao câncer. Além disso, alguns microRNAs (presente trabalho) também foram encontrados diferencialmente expressos em linhagens humanas tumorais quando comparadas a PBMCs normais. Enfim, nossos resultados sugerem

que os perfis de expressão dos microRNAs apresentam grande potencial como uma estratégia eficaz na prática clínica, tanto para o diagnóstico quanto para o tratamento dos pacientes.

7.2. Perfis de expressão de mRNAs em pacientes DM1

A segunda parte do presente trabalho visou identificar genes diferencialmente expressos e grupos gênicos diferencialmente expressos/enriquecidos em pacientes DM1 comparados a indivíduos sadios não diabéticos, dando um maior enfoque em genes/grupos gênicos associados à resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA. Para tal, também foi realizado o método de microarranjos (mRNA), o qual possibilitou a comparação dos níveis de expressão transcricional de genes apresentados pelas PBMCs provenientes de pacientes DM1 e de indivíduos sadios não diabéticos.

Com relação à análise de genes individuais, os resultados indicaram 277 genes diferencialmente expressos em PBMCs de pacientes DM1 comparados ao grupo controle. Entre estes, alguns genes codificam proteínas envolvidas em eventos relacionados ao desenvolvimento do DM1. Por exemplo, de dois genes candidatos ao DM1: *CD69* se encontrou induzido (valor de *fold change* 1,14) e apesar de os grupos de pacientes e controles terem sido pareados por alelos do gene *HLA-DQB1*, este se encontrou reprimido (valor de *fold change* 0,90) em pacientes DM1.

Ainda no que diz respeito ao desenvolvimento do DM1, existe uma associação entre as células T e citocinas pró-inflamatórias. As células T CD8⁺ sintetizam as citocinas pró-inflamatórias INF- γ e TNF- α para induzir a apresentação de autoantígenos e aumentar a expressão de moléculas HLA de classe I e Fas nas células β , deste modo, amplificando a autoimunidade mediada por células T e promovendo destruição das células β (Santamaria 2003; Padgett et al. 2013). Foi também relatado que as células T CD4⁺ produzem as citocinas INF- γ e TNF- α , as quais ativam macrófagos ou outras células acessórias para a destruição das células β (Padgett et al. 2013). Ainda, IL-1 β tem papel na resposta efetora de CD4⁺ (Curtsinger et al. 1999; Ben-Sasson et al. 2009; Padgett et al. 2013). Dentre esses

genes implicados na patogênese do DM1, encontramos *IL1B*, *TNF*, *IFNG* (*IFN γ*), bem como *GZMB* e *GZMH* (esses dois últimos codificam proteínas granzimas envolvidas na morte de células β , como mencionado anteriormente (Podack et al. 1988; Padgett et al. 2013) significativamente induzidos em pacientes DM1 no presente trabalho, apresentando os seguintes valores de *fold change*: 2,60, 2,30, 1,17, 1,22 e 1,16, respectivamente. Assim, nossos resultados indicam alterações na expressão transcricional de genes envolvidos no desenvolvimento do DM1 em pacientes afetados por esta doença, mesmo anos após o diagnóstico.

O DM1 pode ser classificado como um estado pró-inflamatório, evidenciado por níveis significativamente mais altos de biomarcadores plasmáticos de inflamação (proteína reativa C, ligante CD40 e moléculas solúveis de adesão intracelular) exibidos por pacientes comparados a indivíduos sadios (Devaraj et al. 2006). Nossos resultados corroboram outros trabalhos da literatura que demonstraram expressão diferenciada de vários genes relacionados à inflamação em pacientes afetados pelo DM1. Segundo Kaizer et al. (2007), dentre os genes mais induzidos em PBMCs de crianças e adolescentes com DM1 recém-diagnosticadas incluía-se *ILB1* e *PTGS2*. Ainda, Padmos et al. (2008) detectaram um perfil composto por 12 genes induzidos associados principalmente à inflamação (*IL1B*, *IL6*, *TNF*, *PTX3*, *CCL20*, *CXCL2*, *TNFAIP3*, *PTGS2*, *BCL2A1*, *DUSP2*, *ATF3* e *PDE4B*) em monócitos de 28% dos pacientes DM1 estudados (cuja média de idade no momento do diagnóstico era 37 anos e a duração média da doença era nove anos). Com exceção do último gene, todos os outros também se apresentaram diferencialmente induzidos no nosso estudo, com valores de *fold change* que variaram entre 1,27 e 2,60. Além desses genes, outros envolvidos em inflamação foram encontrados significativamente induzidos no nosso estudo, sendo que os que apresentaram os maiores valores de *fold change* foram os seguintes: *CCL3L3* (2,69), *CCL4* (1,75), *CXCL1* (1,66), *CXCL3* (1,98) e *IL8* (1,99). Portanto, apesar de já ser bem reconhecido o papel do processo inflamatório (insulite) no desenvolvimento do DM1, nossos resultados indicaram alterações na expressão transcricional de genes envolvidos em processos inflamatórios em pacientes afetados pelo DM1, mesmo anos após o diagnóstico e a despeito dos tratamentos empregados.

Além de genes acima citados, foram identificados dentre os diferencialmente expressos, genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA (ferramenta Endeavour), sendo que a expressão de seis deles, *DUSP1*, *PTGS2*,

TNFAIP3, *ATF3*, *UCP3* e *FOSB*, foi confirmada pelo método de qRT-PCR. Portanto, esses genes foram selecionados para discussão.

O gene *DUSP1*, o qual foi encontrado induzido em pacientes DM1 (valores de *fold change* 1,43 (microarranjos) e 3,88 (qRT-PCR)), foi o melhor ranqueado em resposta ao estresse oxidativo, sendo que esse gene também foi associado ao reparo do DNA. O *DUSP1* codifica uma proteína fosfatase que especificamente desfosforila e inativa MAPK (do inglês *mitogen-activated protein kinases*) (Sun et al. 1993), a qual tem papel essencial no crescimento celular e proliferação. Liu et al. (2008) demonstraram que em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio, uma linhagem celular humana de câncer de cólon e fibroblastos embrionários de camundongos apresentaram níveis de expressão transcricionais elevados de *DUSP1* e da respectiva proteína, sendo essa indução dependente de TP53. Ainda, Liu et al. (2008) também observaram a interação física entre TP53 e *DUSP1* sob condições de estresse oxidativo e relataram que o sítio palindrômico da região regulatória do gene *DUSP1* é essencial para a transativação do mesmo pela TP53. Além disso, os mesmos autores demonstraram que a superexpressão de *DUSP1* ou a inibição de MAPK leva à suscetibilidade ao estresse oxidativo (Liu et al. 2008). Portanto, a indução do gene *DUSP1* no presente trabalho indica uma resposta ao aumento do estresse oxidativo e consequentemente de danos no DNA já descrito nesses pacientes.

Já o gene *PTGS2* (*COX-2*), o qual também foi encontrado induzido nos pacientes DM1, com valores de *fold change* 1,57 (microarranjos) e 5,83 (qRT-PCR), foi ranqueado em quarto no processo biológico “resposta ao estresse oxidativo”. Esse gene codifica uma das duas isoformas de enzimas limitantes na biossíntese de prostanóides (Smith et al. 1996; Han et al. 2002). O estresse oxidativo é um indutor importante e específico da expressão de *PTGS2*, visto que Feng et al. (1995) demonstraram que superóxido e peróxido de hidrogênio induziram a expressão transcricional desse gene. Além disso, os antioxidantes DMSO e di- e tetrametilurea (DMTU e TMTU, respectivamente) suprimiram essa expressão quando induzida pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF α , sendo que os dois últimos antioxidantes também inibiram a expressão de *PTGS2* induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em células mesangiais de rato (Feng et al. 1995). Similarmente, outro estudo apontou que a exposição de cardiomiócitos primários de ratos neonatais a dois oxidantes, peróxido de hidrogênio e doxorrubicina, resultou na

ativação de uma das subfamílias das MAPKs, ERK1/2 (do inglês *extracellular regulated kinases*), a qual induziu a expressão de *PTGS2* (mRNA e proteína e somente mRNA, respectivamente), o que foi prevenido por enzimas antioxidantes (Adderley e Fitzgerald 1999). Adicionalmente, foi também sugerido que o produto dependente de *PTGS2* (prostaglandinas) protege os cardiomiócitos de danos oxidativos (Adderley e Fitzgerald 1999).

Apesar de *PTGS2* não se encontrar entre os 16 genes melhores ranqueados em reparo do DNA, Han et al. (2002) relataram que a expressão de *PTGS2* (mRNA e proteína) foi induzida pela TP53 e por agentes que causam danos no DNA, os quais acarretam a ativação de TP53. Foi relatado também no mesmo trabalho que *PTGS2* atua como um importante efector da sobrevivência celular (protegendo as células da apoptose) em resposta a estresses genotóxicos que induzem TP53. Deste modo, assim como para *DUSP1*, a indução do gene *PTGS2* no presente trabalho indica uma resposta tanto ao aumento do estresse oxidativo quanto de danos no DNA já descrito nesses pacientes.

O gene *TNFAIP3*, induzido em DM1 com valores de *fold change* 1,44 (microarranjos) e 3,99 (qRT-PCR)), foi um dos 16 genes listados nos dois processos biológicos de interesse “resposta ao estresse oxidativo” e “reparo do DNA”. A proteína codificada por esse gene desempenha função protetora em relação à apoptose. Estudos utilizando células endoteliais demonstraram que esse gene, o qual é induzido por TNF- α , protege essas células da apoptose induzida por essa citocina (Opipari et al. 1990; Opipari et al. 1992), bem como inibe respostas pró-inflamatórias (Cooper et al. 1996; Ferran et al. 1998). De acordo com esses trabalhos, foi relatado que *TNFAIP3* protege as células das ilhotas pancreáticas de ratos contra a indução de apoptose mediada por citocinas (IL-1 β e INF- γ) e também inibe a produção de óxido nítrico, o qual é o principal mediador da via apoptótica ativada por essas citocinas (Grey et al. 1999). Juntamente com o fato de que a expressão de *TNFAIP3* (mRNA) é rapidamente induzida nas ilhotas, tanto de ratos como de humanos após estímulo com a citocina IL-1 β , esses resultados sugerem que *TNFAIP3* faz parte de uma resposta fisiológica protetora contra danos e confirma a função anti-apoptótica e anti-inflamatória desse gene (Grey et al. 1999). Dessa forma, a indução de *TNFAIP3* observada no presente trabalho provavelmente pode ter sido ativada em resposta à indução de genes relacionados ao processo

inflamatório, bem como à indução da via apoptótica nos pacientes (resultados da análise de grupos gênicos que serão discutidos a seguir).

O gene *ATF3* também se apresentou induzido em pacientes DM1 com valores de *fold change* 1,40 (microarranjos) e 3,16 (qRT-PCR), ocupando a quarta posição entre os genes associados ao reparo do DNA. A proteína codificada por *ATF3* pertence à família de fatores de transcrição ATF/CREB (do inglês, *Activating Transcription Factor/cAMP Responsive Element Binding Protein*) (Liang et al. 1996) e atua tanto como regulador negativo da transcrição quando na forma homodimérica (Chen et al. 1994), quanto como regulador positivo da transcrição quando na forma heterodimérica com proteínas JUN (Hsu et al. 1992; Chu et al. 1994). Fan et al. (2002) demonstraram um aumento na expressão da proteína ATF3 após exposição de diferentes linhagens celulares humanas (carcinoma colorretal, carcinoma de mama e carcinoma de pulmão) a três agentes indutores de danos no DNA: metil metanosulfonato, radiação ultravioleta e radiação ionizante, com os dois primeiros agentes gerando lesões nas bases e o último produzindo principalmente quebras no DNA. O mesmo estudo demonstrou que a indução de *ATF3* é rápida, transitória, dose-dependente e mediada por mecanismos transcricionais, pelo menos de forma parcial. Ainda, Mashima et al. (2001) observaram que dentre outros membros da família ATF/CREB, *ATF3* foi a única proteína com expressão aumentada e subsequentemente acumulada e translocada para o núcleo após tratamento com inibidores da DNA topoisomerase (camptotecina e etoposide). Adicionalmente, quando superexpressa, *ATF3* não somente aumentou a ativação das proteases caspases como também amplificou essa ativação após tratamento com esses inibidores, indicando a sua indução associada à indução de apoptose (Mashima et al. 2001). Portanto, esses estudos *in vitro* apontam o envolvimento de *ATF3* em respostas a danos no DNA. Desse modo, nossos resultados sugerem que a indução desse gene pode ter ocorrido em resposta aos níveis maiores de danos no DNA conforme previamente relatado em pacientes DM1.

O gene *UCP3*, por sua vez, o segundo melhor ranqueado em resposta ao estresse oxidativo, foi encontrado reprimido em pacientes DM1 com valores de *fold change* 0,81 (microarranjos) e 0,73 qRT-PCR). A proteína codificada por esse gene, pertencente à família de transportadores mitocondriais, está envolvida na proteção contra o estresse oxidativo, pois um estudo demonstrou que a superexpressão de *UCP3* em neurônios reduziu significativamente a formação de ROS (Vincent et al.

2004). De forma compatível com nossos resultados, o mesmo trabalho indicou que a expressão da proteína UCP3 é reduzida tanto pela hiperglicemia em ratos diabéticos quanto por concentrações elevadas de glicose em culturas de neurônios. Além disso, Flandin et al. (2005) observaram que a condição hiperóxia levou ao aumento dos níveis de expressão de *UCP3* (mRNA e proteína) em células do músculo esquelético de camundongos e na linhagem celular de miotubos de camundongos C2C12 (mRNA). Juntamente com essa indução da expressão de *UCP3*, foi também relatado níveis maiores de estresse oxidativo. Assim, esses resultados indicaram que o estresse oxidativo produzido por hiperóxia acarretou a indução da expressão de *UCP3 in vivo* e *in vitro* e, ainda, sugeriram que UCP3 pode ter papel no metabolismo de ROS (Flandin et al. 2005).

Outro estudo demonstrou que a expressão de *UCP3* é regulada pela associação do fator de transcrição Nrf2, o qual está envolvido na resposta adaptativa ao aumento do estresse oxidativo (Kalyanaraman 2013), à região ARE no promotor de *UCP3* em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio (Anedda et al. 2013). Deste modo, é possível que a repressão do gene *UCP3* em pacientes DM1 observada no presente trabalho, poderia contribuir para o aumento do estresse oxidativo já descrito nesses pacientes.

Por fim, o gene *FOSB* foi encontrado induzido nos pacientes DM1 com valores de *fold change* 1,43 (microarranjos) e 6,82 (qRT-PCR) e ocupou a quinta posição dentre os genes relacionados ao reparo do DNA. Há evidência de que a proteína codificada por esse gene pode ser induzida em resposta ao estresse oxidativo, sendo que a genisteína, um antioxidante potente, significativamente diminuiu a expressão de *FOSB* em queratinócitos quando comparado a células-controle (Jurzak e Adamczyk 2013). Além disso, Jindal e Goswami (2011) demonstraram que tratamento com norepinefrina (NE) induziu a expressão transcricional de *FOSB* na linhagem celular de mioblastos de ratos H9c2. Porém, os autores também relataram que a neutralização do superóxido por um mimético de superóxido dismutase (MnTMPyP) e do peróxido de hidrogênio por catalase (sendo os dois antioxidantes adicionados antes do tratamento com NE) reprimiu consideravelmente os níveis de mRNA do gene *FOSB*. Deste modo, esses resultados indicaram que superóxido e peróxido de hidrogênio têm papel na indução de *FOSB* por NE. Em contraste, em células não tratadas com NE, MnTMPyP induziu a expressão, enquanto o inverso (repressão) foi obtido para a catalase. Portanto, a

regulação de *FOSB* é suscetível a várias condições ou estímulos diferentes, sendo que em conjunto, esses resultados indicaram que as ROS regulam a expressão de *FOSB* tanto em células tratadas com NE como em não tratadas, mas por meio de mecanismos distintos (Jindal e Goswami 2011).

Como mencionado anteriormente, o gene *FOSB* foi encontrado dentre os melhores ranqueados no processo biológico “reparo do DNA”. Apesar de a literatura apontar sua associação com ROS, vale a pena ressaltar que quando em excesso, as ROS podem induzir danos no DNA, entre outros efeitos (Kalyanaraman 2013; Storr et al. 2013). Provavelmente, a indução do gene *FOSB* pode ter ocorrido em resposta a danos no DNA gerados pelo aumento do estresse oxidativo.

De modo geral, observou-se no presente trabalho que a maioria dos genes associados ao reparo do DNA e resposta ao estresse oxidativo (incluindo cinco dos seis supracitados) encontrou-se no estado induzido. Portanto, nossos resultados sobre a análise de genes individuais indicam que uma das respostas aos níveis elevados de estresse oxidativo e danos no DNA previamente observados por outros autores em pacientes DM1, poderia ser por meio de alterações na expressão de genes relacionados a esses dois processos.

Além do presente, apenas alguns outros trabalhos da literatura também detectaram genes diferencialmente modulados em pacientes DM1, cujas funções estão associadas a respostas ao estresse oxidativo e a danos no DNA, por meio da técnica de microarranjos. Em trabalho anterior do nosso grupo, Rassi et al. (2006) encontraram 30 genes diferencialmente expressos em células linfomononucleares provenientes de pacientes DM1, sendo que dentre os processos biológicos atribuídos aos genes induzidos incluíam-se resposta ao estímulo de danos no DNA e estresse oxidativo. Além disso, van Oostrom et al (2009) analisaram os perfis de expressão gênica de células progenitoras endoteliais (EPC, do inglês *epithelial progenitor cell*), diferenciadas a partir de PBMCs *in vitro*, provenientes de pacientes DM1 pré- e pós-suplementação com a vitamina B com propriedades antioxidantes ácido fólico comparados a indivíduos saudáveis. Na comparação entre pacientes DM1 antes da suplementação com ácido fólico e indivíduos não diabéticos foram detectados 1.591 genes diferencialmente expressos. Esses genes foram então classificados em termos GO, destacando-se “resposta ao estresse” e “resposta à hipóxia”. Interessantemente, após suplementação com ácido fólico, 513 dos 1.591 genes diferencialmente expressos em EPCs dos pacientes foram normalizados a

níveis similares aos do grupo controle. Conforme esperado, dentre os genes com expressão normalizada foram encontrados genes implicados em estresse oxidativo. Por fim, o fator de transcrição *MAFF* (do inglês *V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F*), que se liga a outro fator de transcrição, Nrf2, o qual está envolvido na resposta adaptativa ao aumento do estresse oxidativo (Kalyanaraman 2013), foi encontrado diferencialmente reprimido nos pacientes DM1 e a suplementação com ácido também normalizou a expressão desse gene (van Oostrom et al. 2009). O gene *MAFF* também foi encontrado diferencialmente expresso nos pacientes DM1 no presente trabalho, porém induzido (valor de *fold change* 1,22).

Ainda com relação às análises de dados de microarranjos em DM1, ao investigarem os perfis de expressão gênica apresentados por monócitos CD14⁺ (purificados do sangue periférico) de crianças com DM1 recém-diagnosticadas e adultos saudáveis, Irvine et al. (2012) observaram dois perfis distintos de expressão exibidos pelos pacientes, sendo que um dos grupos de pacientes, denominado B, agrupou separadamente tanto do outro sub-grupo de pacientes quanto do grupo controle. Os perfis de expressão dos monócitos provenientes dos pacientes do grupo B indicaram ativação celular por meio de estresse, incluindo resposta a proteínas não dobradas (UPR, do inglês *unfolded protein response*), consequência do estresse do retículo endoplasmático (RE). Além disso, os mesmos autores relataram indução de *HIF1A*, um dos principais mediadores de estresse oxidativo, e de alguns de seus alvos (*DDIT4*, *PFKFB3* e *ADM*) (Geiger et al. 2011; Ruiz-Garcia et al. 2011) nos monócitos dos pacientes do grupo B. Em contraste, *DDIT4*, *PFKFB3* e *ADM* foram encontrados induzidos no presente trabalho, com valores de *fold change* 1,16, 1,24 e 1,20, respectivamente. Em relação aos genes reprimidos, Irvine et al. (2012) identificaram vários que estão envolvidos em vias celulares antioxidantes, indicando perturbação dos sistemas protetores.

Os processos biológicos “estresse oxidativo” e “estresse do RE” estão estreitamente associados. Estresse oxidativo pode promover estresse do RE, sendo que em resposta ao mesmo, RE ativa o programa transcricional UPR (Martinon e Glimcher 2011). Falha do sistema UPR resulta em estresse prolongado no RE, induzindo apoptose e inflamação. Desta forma, genes que controlam a apoptose estavam enriquecidos em monócitos dos pacientes do grupo B (Irvine et al. 2012). Em conjunto, nosso trabalho adiciona-se à lista dos outros poucos que detectaram

modulação de genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA em pacientes DM1 comparados a indivíduos saudáveis por meio do método de microarranjos, sendo que identificamos genes relacionados a esses dois processos biológicos que não haviam sido relatados anteriormente.

Além da análise dos perfis de expressão de gene individuais visando investigar se alterações sutis, porém coordenadas, na expressão de genes (co-regulados) podem em conjunto tornar um processo significativamente expresso ou significativamente enriquecido, análises de grupos gênicos (GSA e GSEA, respectivamente) foram também realizadas. Dentre os 95 grupos de genes encontrados significativamente expressos ou enriquecidos ($p < 0,005$) comparando pacientes com DM1 ao grupo controle, cinco grupos são de interesse para o presente trabalho: via de sinalização apoptótica (GO:0097190), resposta ao hidróperóxido (GO:0033194), reparo de quebras de fita dupla via recombinação homóloga (HR) (GO:0000724)/reparo recombinacional (GO:0000725) e resposta ao estresse do retículo endoplasmático (GO:0034976).

A via de sinalização apoptótica foi encontrada significativamente induzida em pacientes DM1 comparados ao grupo controle no presente trabalho. O processo de apoptose ou morte celular programada é dependente de energia e envolve uma complexa via de sinalização, a qual ocorre de forma ordenada e conectada a vários processos celulares, apresentando características bioquímicas e morfológicas específicas (Elmore 2007). Inicialmente, a apoptose foi descrita como um processo ligado ao desenvolvimento e envelhecimento, além de representar um mecanismo ligado à homeostase, que proporciona a manutenção das populações celulares em tecidos (Elmore 2007). Porém, esse tipo de morte celular programada também atua como um mecanismo de defesa em resposta a células danificadas, seja por doença ou sob a ação de agentes nocivos (Norbury e Hickson 2001).

Estudos relataram que o dano oxidativo no DNA foi correlacionado com a indução de apoptose no intestino delgado (Hong et al. 2005; Westbrook et al. 2009) e que PBMCs de indivíduos afetados por DM1 exibiam uma superexpressão de *MYC* associada à desregulação de vários genes relacionados à apoptose (Kaizer et al. 2007). Deste modo, nossos resultados indicam que a indução dessa via poderia ser decorrente também do aumento do estresse oxidativo e consequentemente de danos no DNA previamente relatado em pacientes DM1.

As vias “resposta ao hidróperóxido” e “reparo de quebras de fita dupla via recombinação homóloga (HR)/reparo recombinacional” foram encontradas significativamente enriquecidas nos pacientes DM1 de acordo com o presente estudo. Com relação aos hidróperóxidos, estes são resultantes de radicais e sua decomposição gera outros radicais, levando à formação de lesões no DNA, como bases oxidadas e ligações cruzadas entre DNA e proteínas (Gebicki e Gebicki 1999; Luxford et al. 1999). Quanto às quebras de fita dupla, as quais podem também ser consequência do estresse oxidativo (Valko et al. 2007), estas são lesões graves, podendo gerar rearranjos genômicos e até mesmo morte celular. Um dos mecanismos principais para reparar este tipo de lesão é o HR, o qual é bastante preciso pelo fato de utilizar a fita homóloga de DNA (Chapman et al. 2012). Portanto, enriquecimento dessas duas vias observado em pacientes DM1 poderia ser uma resposta ao aumento do estresse oxidativo e consequentemente danos no DNA previamente relatado em pacientes afetados por essa doença.

Por fim, a via “resposta ao estresse do retículo endoplasmático” também foi encontrada significativamente enriquecida em pacientes DM1 no presente trabalho. O estresse do RE é definido como respostas celulares a eventos que interferem nas funções normais dessa organela, as quais incluem facilitação do dobramento e montagem de proteínas, transporte de proteínas sintetizadas em cisternas, armazenamento de cálcio intracelular, dentre outras (Zhong et al. 2012). O estresse do RE mais estudado é consequência de proteínas mal dobradas e o acúmulo destas induz o sistema UPR para normalizar as funções do RE, assim, esse sistema UPR atua como um mecanismo protetor que vigia e mantém a homeostase do RE; no entanto, quando UPR não executa suas funções apropriadamente, as células estão sujeitas à apoptose (Zhong et al. 2012). Durante o desenvolvimento do DM1, citocinas pró-inflamatórias são secretadas por células autorreativas, o que resulta em estresse do RE, que por sua vez, medeia a eliminação das células β (Zhong et al. 2012). Além disso, devido à redução da massa das células β , existe a necessidade de as células funcionais remanescentes elevarem a síntese de insulina para compensar o aumento da demanda deste hormônio em DM1, o que acarreta o estresse do RE. Assim sendo, o estresse do RE está implicado na eliminação das células produtoras de insulina durante o desenvolvimento do DM1 (Zhong et al. 2012), já que o primeiro pode ampliar a apresentação de antígenos das células β ao sistema imune, inflamação e as vias pró-apoptóticas (Marhfour et al. 2012).

De fato, Marhfour et al. (2012) investigaram a presença de três marcadores do estresse do RE, CHOP (do inglês *C/EBP homologous protein*), BIP (do inglês *immunoglobulin heavy chain*) e XBP-1 (do inglês *X-box binding protein 1*) em seções pancreáticas de pacientes com DM1 e indivíduos não diabéticos, tendo observado níveis maiores de CHOP em ilhotas de pacientes e, no caso de ilhotas positivas para insulite, de BIP. Assim, esse estudo indicou que as células das ilhotas de pacientes DM1 apresentaram uma resposta parcial ao estresse do RE, já que alguns dos componentes da UPR foram encontrados induzidos (Marhfour et al. 2012). Portanto, nossos resultados de que a via “resposta ao estresse do RE” foi encontrada significativamente enriquecida em pacientes DM1 corroboram os dados da literatura que sugerem a desregulação desta via em DM1.

Conforme o exposto, a análise do transcriptoma global demonstrou um perfil distinto de expressão gênica entre pacientes DM1 comparados a indivíduos saudáveis não diabéticos, destacando-se genes que codificam proteínas envolvidas em eventos relacionados ao desenvolvimento do DM1, incluindo processos inflamatórios, bem como genes associados com resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA. Além disso, os resultados da análise de genes individuais se mostraram condizentes com os da análise de grupos gênicos, sugerindo que uma das respostas aos níveis elevados de estresse oxidativo e danos no DNA, previamente observados em pacientes com DM1 por outros autores, é mediada por alterações na expressão transcricional de genes e grupos gênicos relacionados a esses dois processos.

7.3. Interações microRNA-mRNA

Em humanos, tem sido relatado que pelo menos 50% do transcriptoma é regulado por microRNAs, (Bartel 2009; Rigoutsos 2009; Pasquinelli 2012), os quais estão implicados em vários processos biológicos como desenvolvimento, diferenciação, apoptose, proliferação (Bartel 2004) e reparo do DNA (Lal et al. 2009; Hu et al. 2010; Valeri et al. 2010), dentre outros. Assim, existe a possibilidade de que os 44 microRNAs com expressão significativa em DM1, os quais apresentaram valores de AUC $\geq 0,90$ no presente trabalho, possam interferir em inúmeros

processos biológicos nesses pacientes, por meio da regulação pós-transcricional de seus alvos. Por esse motivo, os dados de expressão de microRNAs e de mRNAs foram combinados, buscando assim, proporcionar um melhor entendimento sobre as vias de regulação de genes associados ao DM1, dando enfoque a genes implicados em resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA. Até o presente, não foi ainda relatado na literatura nenhum dado relacionado a esse tipo de abordagem em DM1.

Nossos resultados indicaram que 52% dos genes encontrados diferencialmente expressos são alvos preditos dos 44 microRNAs que claramente estratificaram o grupo de pacientes do grupo controle. Dentre esses alvos destacaram-se dois candidatos ao DM1, *CD69* e *HLA-DQB1*, assim como outros genes envolvidos em eventos moleculares e celulares que estão associados ao DM1, incluindo processos inflamatórios (*IL1B*, *IFNG*, *IL6*, *PTX3*, *CCL20*, *CXCL2*, *DUSP2*). Além disso, nove e 13 genes (sendo quatro em comum) dos diferencialmente expressos envolvidos em resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA, respectivamente, também foram preditos como alvos dos microRNAs encontrados modulados no presente trabalho; desses genes, três foram selecionados para a avaliação da expressão das respectivas proteínas: *ATF3*, *PTGS2* e *DUSP1*.

Nossos resultados de expressão proteica para os três genes, por *western blotting*, não foram compatíveis com os dados de expressão de mRNAs, os quais apontaram indução da expressão transcricional dos respectivos genes no grupo de pacientes. Não observamos níveis de expressão detectáveis para as proteínas *PTGS2* e *ATF3* em nenhum dos dois grupos estudados (pacientes DM1 e indivíduos saudáveis). No caso da proteína *DUSP1*, observamos níveis de expressão detectáveis para os dois grupos, porém, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os mesmos. Visto que a expressão transcricional dos genes *PTGS2*, *ATF3* e *DUSP1* foi induzida em pacientes DM1 comparados ao grupo controle, mas alterações na expressão das respectivas proteínas não foram observadas comparando os dois grupos, é plausível que algum mecanismo possa controlar negativamente a tradução dos mRNAs. Uma possibilidade seria a regulação negativa da tradução mediada por microRNAs.

Deste modo, os dados de expressão proteica e de expressão de microRNAs sugeriram a possibilidade da contribuição dos sete microRNAs induzidos que foram preditos como reguladores de *DUSP1* (*hsa-let-7f*; *hsa-let-7g*; *hsa-miR-32*; *hsa-miR-*

98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b) para a inibição da tradução dessa proteína. O mesmo também poderia ocorrer para os oito microRNAs induzidos preditos como reguladores de PTGS2 (hsa-miR-7, hsa-miR-26b, hsa-miR-33a, hsa-miR-101, hsa-miR-148a, hsa-miR-148b, hsa-miR-542-3p, hsa-miR-548c-3p) e os sete microRNAs induzidos preditos como reguladores de ATF3 (hsa-miR-7, hsa-miR-16, hsa-miR-27b, hsa-miR-195, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-542-3p, hsa-miR-424).

Nossos resultados sobre as interações entre microRNAs e seus alvos foram baseados, a princípio, em análises *in silico* (predições dos alvos por ferramentas bioinformáticas) e nos resultados de expressão dos alvos (mRNAs analisados por microarranjos e qRT-PCR, bem como proteínas por *western blotting*) e dos microRNAs (microarranjos e qRT-PCR). Com o objetivo de verificar a ocorrência de algumas dessas interações em meio celular foi realizado um ensaio funcional, do gene repórter luciferase. Nesse ensaio, havendo interação entre o microRNA e a região 3' UTR do mRNA de interesse, a atividade da luciferase é reduzida ou totalmente inibida; ao contrário, não havendo interação, a atividade da luciferase é consistente.

Para a realização do ensaio funcional acima mencionado, selecionamos as interações entre hsa-miR-148a e *PTGS2* ou *DUSP1*. A ocorrência da interação entre hsa-miR-148a e *PTGS2* não foi observada, porém, nossas predições de que hsa-miR-148a associa-se a uma porção da 3' UTR do mRNA de *DUSP1* foram confirmadas em meio celular. No entanto, é importante ressaltar que experimentos como este não mimetizam exatamente o contexto natural da regulação que hsa-miR-148a exerce sobre *DUSP1*, tanto no que diz respeito à sequência-alvo do mRNA quanto ao contexto celular endógeno, pois existem vários fatores envolvidos na regulação da capacidade de ligação do miRISC, bem como na repressão dos alvos (Pasquinelli 2012). Não obstante, de acordo com nossos resultados, apesar de os níveis de mRNA de *DUSP1* se mostrarem induzidos nos pacientes DM1 (conforme demonstrado por ambos os métodos, microarranjos e qRT-PCR), não observamos alterações na expressão dessa proteína (*western blotting*) nos pacientes. Assim, nossos resultados do ensaio funcional indicam a possibilidade de hsa-miR-148a atuar na repressão traducional de *DUSP1*.

Nesta terceira parte apontamos interações entre os perfis de expressão de microRNAs e os perfis de expressão de mRNAs exibidos por PBMCs de pacientes DM1, sendo uma dessas interações confirmadas em meio celular. Este foi o primeiro

estudo a integrar dados de expressão de microRNA e de mRNAs, obtidos em escala genômica, bem como de algumas proteínas, em pacientes DM1 quando comparados a indivíduos sadios não diabéticos. Portanto, o presente estudo realizado em PBMCs de pacientes DM1 evidenciou dados inéditos sobre a regulação gênica por microRNAs, principalmente para genes-alvos destes que desempenham funções associadas à resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA, conforme focalizado neste trabalho.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Nossos resultados indicaram perfis distintos de expressão de microRNAs e de mRNAs em PBMCs de pacientes DM1 comparados a indivíduos saudáveis não diabéticos. Assim, as PBMCs mostraram-se alvos importantes para o estudo do DM1. Além disso, nossos resultados evidenciaram dados inéditos sobre a regulação gênica por microRNAs, com enfoque em genes-alvos destes com funções associadas à resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA, cuja expressão gênica também foi avaliada experimentalmente. Por fim, essas alterações na expressão de microRNAs e genes codificadores de proteínas sugerem distúrbios na rede microRNA-gene alvo em pacientes DM1.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADA (American Diabetes Association) (2013) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care** 36 Suppl 1:S67-74.

Adderley, S.R.; Fitzgerald, D.J. (1999) Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. **J Biol Chem** 274:5038-5046.

Aerts, S.; Lambrechts, D.; Maity, S. et al. (2006) Gene prioritization through genomic data fusion. **Nat Biotechnol** 24:537-544.

Agbaje, I.M.; McVicar, C.M.; Schock, B.C. et al. (2008) Increased concentrations of the oxidative DNA adduct 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine in the germ-line of men with type 1 diabetes. **Reprod Biomed Online** 16:401-409.

Ahmad, F.K.; He, Z.; King, G.L. (2005) Molecular targets of diabetic cardiovascular complications. **Curr Drug Targets** 6:487-494.

Alves, C.; Meyer, I.; Vieira, N. et al. (2006) [Distribution and frequency of HLA alleles and haplotypes in Brazilians with type 1 diabetes mellitus]. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 50:436-444.

Anedda, A.; Lopez-Bernardo, E.; Acosta-Iborra, B. et al. (2013) The transcription factor Nrf2 promotes survival by enhancing the expression of uncoupling protein 3 under conditions of oxidative stress. **Free Radic Biol Med** 61:395-407.

Antonelli, A.; Fallahi, P.; Ferrari, S.M. et al. (2008) Serum Th1 (CXCL10) and Th2 (CCL2) chemokine levels in children with newly diagnosed Type 1 diabetes: a longitudinal study. **Diabet Med** 25:1349-1353.

Argyropoulos, C.; Wang, K.; McClarty, S. et al. (2013) Correction: Urinary MicroRNA Profiling in the Nephropathy of Type 1 Diabetes. **PLoS One** 8.

Atkinson, M.A.; Eisenbarth, G.S. (2001) Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet** 358:221-229.

Baker, L.; Kaye, R.; Root, A.W. (1967) The early partial remission of juvenile diabetes mellitus. The roles of insulin and growth hormone. **J Pediatr** 71:825-831.

Barnes, D.E.; Lindahl, T. (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. **Annu Rev Genet** 38:445-476.

Barrett, J.C.; Clayton, D.G.; Concannon, P. et al. (2009) Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. **Nat Genet** 41:703-707.

Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell** 116:281-297.

Bartel, D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell** 136:215-233.

Behm-Ansmant, I.; Rehwinkel, J.; Doerks, T. et al. (2006) mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. **Genes Dev** 20:1885-1898.

Bell, G.I.; Horita, S.; Karam, J.H. (1984) A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes** 33:176-183.

Ben-Sasson, S.Z.; Hu-Li, J.; Quiel, J. et al. (2009) IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 106:7119-7124.

Bengtsson, H. (Preprint 2004:18) Aroma - An R Object-oriented Microarray Analysis environment. Centre for Mathematical Sciences, Lund University. <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/aroma.light.html>. Acesso Março 10, 2013.

Berezikov, E.; Chung, W.J.; Willis, J. et al. (2007) Mammalian mirtron genes. **Mol Cell** 28:328-336.

Berezikov, E.; Cuppen, E.; Plasterk, R.H. (2006) Approaches to microRNA discovery. **Nat Genet** 38 Suppl:S2-7.

Bernstein, E.; Caudy, A.A.; Hammond, S.M.; Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature** 409:363-366.

Bostjancic, E.; Zidar, N.; Stajer, D.; Glavac, D. (2010) MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. **Cardiology** 115:163-169.

Bottini, N.; Musumeci, L.; Alonso, A. et al. (2004) A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. **Nat Genet** 36:337-338.

Bracht, J.; Hunter, S.; Eachus, R. et al. (2004) Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. **RNA** 10:1586-1594.

Bracken, C.P.; Szubert, J.M.; Mercer, T.R. et al. (2011) Global analysis of the mammalian RNA degradome reveals widespread miRNA-dependent and miRNA-independent endonucleolytic cleavage. **Nucleic Acids Res** 39:5658-5668.

Brennecke, J.; Stark, A.; Russell, R.B.; Cohen, S.M. (2005) Principles of microRNA-target recognition. **PLoS Biol** 3:e85.

Brownlee, M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature** 414:813-820.

Burren, O.S.; Adlem, E.C.; Achuthan, P. et al. (2011) T1DBase: update 2011, organization and presentation of large-scale data sets for type 1 diabetes research. **Nucleic Acids Res** 39:D997-1001.

Bushati, N.; Cohen, S.M. (2007) microRNA functions. **Annu Rev Cell Dev Biol** 23:175-205.

Cai, X.; Hagedorn, C.H.; Cullen, B.R. (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. **RNA** 10:1957-1966.

Chapman, J.R.; Taylor, M.R.; Boulton, S.J. (2012) Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. **Mol Cell** 47:497-510.

Chen, B.P.; Liang, G.; Whelan, J.; Hai, T. (1994) ATF3 and ATF3 delta Zip. Transcriptional repression versus activation by alternatively spliced isoforms. **J Biol Chem** 269:15819-15826.

Chendrimada, T.P.; Finn, K.J.; Ji, X. et al. (2007) MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. **Nature** 447:823-828.

Chessel, D.; Dufour, A.B.; Thioulouse, J. (2004) The ade4 package - I: One-table methods. 4:5-10.

Chu, H.M.; Tan, Y.; Kobierski, L.A. et al. (1994) Activating transcription factor-3 stimulates 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent gene expression. **Mol Endocrinol** 8:59-68.

Cnop, M.; Welsh, N.; Jonas, J.C. et al. (2005) Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes** 54 Suppl 2:S97-107.

Codoner-Franch, P.; Pons-Morales, S.; Boix-Garcia, L.; Valls-Belles, V. (2010) Oxidant/antioxidant status in obese children compared to pediatric patients with type 1 diabetes mellitus. **Pediatr Diabetes** 11:251-257.

Cooper, J.T.; Stroka, D.M.; Brostjan, C. et al. (1996) A20 blocks endothelial cell activation through a NF-kappaB-dependent mechanism. **J Biol Chem** 271:18068-18073.

Curtsinger, J.M.; Schmidt, C.S.; Mondino, A. et al. (1999) Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. **J Immunol** 162:3256-3262.

da Costa, R.M.A.; Menck, C.F.M. (2004) Genes de Reparo de DNA, Oncologia molecular. São Paulo.

Danowski, N.; Manthey, I.; Jakob, H.G. et al. (2013) Decreased expression of miR-133a but not of miR-1 is associated with signs of heart failure in patients undergoing coronary bypass surgery. **Cardiology** 125:125-130.

Delmastro, M.M.; Piganelli, J.D. (2011) Oxidative stress and redox modulation potential in type 1 diabetes. **Clin Dev Immunol** 2011:593863.

Denli, A.M.; Tops, B.B.; Plasterk, R.H. et al. (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. **Nature** 432:231-235.

Derbinski, J.; Kyewski, B. (2010) How thymic antigen presenting cells sample the body's self-antigens. **Curr Opin Immunol** 22:592-600.

Devaraj, S.; Glaser, N.; Griffen, S. et al. (2006) Increased monocytic activity and biomarkers of inflammation in patients with type 1 diabetes. **Diabetes** 55:774-779.

DIAMOND Project Group (2006) Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. **Diabet Med** 23:857-866.

Diez, J.; Park, Y.; Zeller, M. et al. (2001) Differential splicing of the IA-2 mRNA in pancreas and lymphoid organs as a permissive genetic mechanism for autoimmunity against the IA-2 type 1 diabetes autoantigen. **Diabetes** 50:895-900.

Dincer, Y.; Akcay, T.; Ilkova, H. et al. (2003) DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with Type I diabetes mellitus. **Mutat Res** 527:49-55.

Dizdaroglu, M. (2012) Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. **Cancer Lett** 327:26-47.

Doench, J.G.; Sharp, P.A. (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. **Genes Dev** 18:504-511.

Dogra, R.S.; Vaidyanathan, P.; Prabakar, K.R. et al. (2006) Alternative splicing of G6PC2, the gene coding for the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP), results in differential expression in human thymus and spleen compared with pancreas. **Diabetologia** 49:953-957.

Dong, Y.; Zhao, J.; Wu, C.W. et al. (2013) Tumor suppressor functions of miR-133a in colorectal cancer. **Mol Cancer Res** 11:1051-1060.

Drews, G.; Krippeit-Drews, P.; Dufer, M. (2010) Oxidative stress and beta-cell dysfunction. **Pflugers Arch** 460:703-718.

Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev** 82:47-95.

Du, T.; Zamore, P.D. (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. **Development** 132:4645-4652.

Durinovic-Bello, I.; Wu, R.P.; Gersuk, V.H. et al. (2010) Insulin gene VNTR genotype associates with frequency and phenotype of the autoimmune response to proinsulin. **Genes Immun** 11:188-193.

Dweep, H.; Sticht, C.; Pandey, P.; Gretz, N. (2011) miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. **J Biomed Inform** 44:839-847.

Eisenbarth, G.S. (1986) Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **N Engl J Med** 314:1360-1368.

Eizirik, D.L.; Colli, M.L.; Ortis, F. (2009) The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. **Nat Rev Endocrinol** 5:219-226.

Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol** 35:495-516.

Fabian, M.R.; Sonenberg, N.; Filipowicz, W. (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. **Annu Rev Biochem** 79:351-379.

Enhanced Heat Map (heatmap.2).
<http://hosho.ees.hokudai.ac.jp/~kubo/Rdoc/library/gplots/html/heatmap.2.html>.
Acesso Abril 10, 2013.

Fan, F.; Jin, S.; Amundson, S.A. et al. (2002) ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and over-expression of ATF3 protein suppresses cells growth. **Oncogene** 21:7488-7496.

Feng, L.; Xia, Y.; Garcia, G.E. et al. (1995) Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. **J Clin Invest** 95:1669-1675.

Ferran, C.; Stroka, D.M.; Badrichani, A.Z. et al. (1998) A20 inhibits NF-kappaB activation in endothelial cells without sensitizing to tumor necrosis factor-mediated apoptosis. **Blood** 91:2249-2258.

Filipowicz, W.; Bhattacharyya, S.N.; Sonenberg, N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nat Rev Genet** 9:102-114.

Finnegan, E.F.; Pasquinelli, A.E. (2013) MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. **Crit Rev Biochem Mol Biol** 48:51-68.

Flandin, P.; Donati, Y.; Barazzzone-Argiroffo, C.; Muzzin, P. (2005) Hyperoxia-mediated oxidative stress increases expression of UCP3 mRNA and protein in skeletal muscle. **FEBS Lett** 579:3411-3415.

Friedberg, E.C.; Walker, G.C.; Siede, W. et al. (2006) DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington, D.C.

Gan, M.J.; Albanese-O'Neill, A.; Haller, M.J. (2012) Type 1 diabetes: current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care** 42:269-291.

Gebicki, S.; Gebicki, J.M. (1999) Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides. **Biochem J** 338 (Pt 3):629-636.

Geiger, K.; Leiherer, A.; Muendlein, A. et al. (2011) Identification of hypoxia-induced genes in human SGBS adipocytes by microarray analysis. **PLoS One** 6:e26465.

Glawe, J.D.; Mijalis, E.M.; Davis, W.C. et al. (2013) SDF-1-CXCR4 differentially regulates autoimmune diabetogenic T cell adhesion through ROBO1-SLIT2 interactions in mice. **Diabetologia** 56:2222-2230.

Goodarzi, M.T.; Navidi, A.A.; Rezaei, M.; Babahmadi-Rezaei, H. (2010) Oxidative damage to DNA and lipids: correlation with protein glycation in patients with type 1 diabetes. **J Clin Lab Anal** 24:72-76.

Gregory, R.I.; Yan, K.P.; Amuthan, G. et al. (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. **Nature** 432:235-240.

Grey, F.; Tirabassi, R.; Meyers, H. et al. (2010) A viral microRNA down-regulates multiple cell cycle genes through mRNA 5'UTRs. **PLoS Pathog** 6:e1000967.

Grey, S.T.; Arvelo, M.B.; Hasenkamp, W. et al. (1999) A20 inhibits cytokine-induced apoptosis and nuclear factor kappaB-dependent gene activation in islets. **J Exp Med** 190:1135-1146.

Griffiths-Jones, S. (2004) The microRNA Registry. **Nucleic Acids Res** 32:D109-111.

Griffiths-Jones, S.; Grocock, R.J.; van Dongen, S. et al. (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic Acids Res** 34:D140-144.

Griffiths-Jones, S.; Saini, H.K.; van Dongen, S.; Enright, A.J. (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. **Nucleic Acids Res** 36:D154-158.

Grimson, A.; Farh, K.K.; Johnston, W.K. et al. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. **Mol Cell** 27:91-105.

Gwizdek, C.; Ossareh-Nazari, B.; Brownawell, A.M. et al. (2003) Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. **J Biol Chem** 278:5505-5508.

Hafner, M.; Landthaler, M.; Burger, L. et al. (2010) Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. **Cell** 141:129-141.

Haller, M.J.; Atkinson, M.A.; Schatz, D. (2005) Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. **Pediatr Clin North Am** 52:1553-1578.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (2007) Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford.

Han, J.; Lee, Y.; Yeom, K.H. et al. (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. **Cell** 125:887-901.

Han, J.A.; Kim, J.I.; Ongusaha, P.P. et al. (2002) P53-mediated induction of Cox-2 counteracts p53- or genotoxic stress-induced apoptosis. **EMBO J** 21:5635-5644.

Hannon-Fletcher, M.P.; O'Kane, M.J.; Moles, K.W. et al. (2000) Levels of peripheral blood cell DNA damage in insulin dependent diabetes mellitus human subjects. **Mutat Res** 460:53-60.

Hata, I.; Kaji, M.; Hirano, S. et al. (2006) Urinary oxidative stress markers in young patients with type 1 diabetes. **Pediatr Int** 48:58-61.

Helwak, A.; Kudla, G.; Dudnakova, T.; Tollervey, D. (2013) Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. **Cell** 153:654-665.

Henke, J.I.; Goergen, D.; Zheng, J. et al. (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. **EMBO J** 27:3300-3310.

Hezova, R.; Slaby, O.; Faltejskova, P. et al. (2010) microRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. **Cell Immunol** 260:70-74.

Hierarchical Clustering (hclust). <http://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/hclust.html>. Acesso Abril 10, 2013.

Hong, F.; Breitling, R.; McEntee, C.W. et al. (2006) RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. **Bioinformatics** 22:2825-2827.

Hong, M.Y.; Turner, N.D.; Carroll, R.J. et al. (2005) Differential response to DNA damage may explain different cancer susceptibility between small and large intestine. **Exp Biol Med (Maywood)** 230:464-471.

Hsu, J.C.; Bravo, R.; Taub, R. (1992) Interactions among LRF-1, JunB, c-Jun, and c-Fos define a regulatory program in the G1 phase of liver regeneration. **Mol Cell Biol** 12:4654-4665.

Hu, H.; Du, L.; Nagabayashi, G. et al. (2010) ATM is down-regulated by N-Myc-regulated microRNA-421. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107:1506-1511.

Hu, W.; Coller, J. (2012) What comes first: translational repression or mRNA degradation? The deepening mystery of microRNA function. **Cell Res** 22:1322-1324.

Huang, D.W.; Sherman, B.T.; Lempicki, R.A. (2009a) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Res** 37:1-13.

Huang, D.W.; Sherman, B.T.; Lempicki, R.A. (2009b) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nat Protoc** 4:44-57.

Humphreys, D.T.; Westman, B.J.; Martin, D.I.; Preiss, T. (2005) MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102:16961-16966.

Hutvagner, G.; McLachlan, J.; Pasquinelli, A.E. et al. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. **Science** 293:834-838.

Hwang, H.W.; Wentzel, E.A.; Mendell, J.T. (2007) A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. **Science** 315:97-100.

IDF (International Diabetes Federation) (2013) The IDF Diabetes Atlas 6th edition. Brussels.

In't Veld, P. (2011) Insulinitis in human type 1 diabetes: The quest for an elusive lesion. **Islets** 3:131-138.

Irvine, K.M.; Gallego, P.; An, X. et al. (2012) Peripheral blood monocyte gene expression profile clinically stratifies patients with recent-onset type 1 diabetes. **Diabetes** 61:1281-1290.

Jamieson, N.B.; Morran, D.C.; Morton, J.P. et al. (2012) MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. **Clin Cancer Res** 18:534-545.

Jiang, F.; Zhang, Y.; Dusting, G.J. (2011) NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. **Pharmacol Rev** 63:218-242.

Jindal, E.; Goswami, S.K. (2011) In cardiac myoblasts, cellular redox regulates FosB and Fra-1 through multiple cis-regulatory modules. **Free Radic Biol Med** 51:1512-1521.

Johnson, W.E.; Li, C.; Rabinovic, A. (2007) Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. **Biostatistics** 8:118-127.

Jurzak, M.; Adamczyk, K. (2013) Influence of genistein on c-Jun, c-Fos and Fos-B of AP-1 subunits expression in skin keratinocytes, fibroblasts and keloid fibroblasts cultured in vitro. **Acta Pol Pharm** 70:205-213.

Kaizer, E.C.; Glaser, C.L.; Chaussabel, D. et al. (2007) Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes. **J Clin Endocrinol Metab** 92:3705-3711.

Kalyanaraman, B. (2013) Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biol** 1:244-257.

Khvorova, A.; Reynolds, A.; Jayasena, S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell** 115:209-216.

Kim, V.N.; Han, J.; Siomi, M.C. (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. **Nat Rev Mol Cell Biol** 10:126-139.

Klinke, D.J., 2nd (2008) Extent of beta cell destruction is important but insufficient to predict the onset of type 1 diabetes mellitus. **PLoS One** 3:e1374.

Kozomara, A.; Griffiths-Jones, S. (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. **Nucleic Acids Res** 39:D152-157.

Krek, A.; Grun, D.; Poy, M.N. et al. (2005) Combinatorial microRNA target predictions. **Nat Genet** 37:495-500.

Krol, J.; Loedige, I.; Filipowicz, W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nat Rev Genet** 11:597-610.

Lagos-Quintana, M.; Rauhut, R.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science** 294:853-858.

Lal, A.; Pan, Y.; Navarro, F. et al. (2009) miR-24-mediated downregulation of H2AX suppresses DNA repair in terminally differentiated blood cells. **Nat Struct Mol Biol** 16:492-498.

Lau, N.C.; Lim, L.P.; Weinstein, E.G.; Bartel, D.P. (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science** 294:858-862.

Lee, R.C.; Ambros, V. (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science** 294:862-864.

Lee, R.C.; Feinbaum, R.L.; Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell** 75:843-854.

Lee, Y.; Ahn, C.; Han, J. et al. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature** 425:415-419.

Lee, Y.; Kim, M.; Han, J. et al. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J** 23:4051-4060.

Lenzen, S. (2008) Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. **Biochem Soc Trans** 36:343-347.

Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell** 88:323-331.

Lewis, B.P.; Burge, C.B.; Bartel, D.P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell** 120:15-20.

Lewis, B.P.; Shih, I.H.; Jones-Rhoades, M.W. et al. (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. **Cell** 115:787-798.

Li, L.; Xia, Y.; Wang, Z. et al. (2011) Suppression of the PI3K-Akt pathway is involved in the decreased adhesion and migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from non-obese diabetic mice. **Cell Biol Int** 35:961-966.

Liang, G.; Wolfgang, C.D.; Chen, B.P. et al. (1996) ATF3 gene. Genomic organization, promoter, and regulation. **J Biol Chem** 271:1695-1701.

Lim, L.P.; Lau, N.C.; Garrett-Engele, P. et al. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. **Nature** 433:769-773.

Lim, L.P.; Lau, N.C.; Weinstein, E.G. et al. (2003) The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. **Genes Dev** 17:991-1008.

Lin, L.; Lin, Y.; Jin, Y.; Zheng, C. (2013) Microarray analysis of microRNA expression in liver cancer tissues and normal control. **Gene** 523:158-160.

Liu, J.; Carmell, M.A.; Rivas, F.V. et al. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science** 305:1437-1441.

Liu, Y.X.; Wang, J.; Guo, J. et al. (2008) DUSP1 is controlled by p53 during the cellular response to oxidative stress. **Mol Cancer Res** 6:624-633.

Lowe, C.E.; Cooper, J.D.; Brusko, T. et al. (2007) Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. **Nat Genet** 39:1074-1082.

Lund, E.; Guttinger, S.; Calado, A. et al. (2004) Nuclear export of microRNA precursors. **Science** 303:95-98.

Luxford, C.; Morin, B.; Dean, R.T.; Davies, M.J. (1999) Histone H1- and other protein- and amino acid-hydroperoxides can give rise to free radicals which oxidize DNA. **Biochem J** 344 Pt 1:125-134.

Maechler, M.; Rousseeuw, P.; Struyf, A. et al. (2013) Cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 1.14.4. <http://cran.r-project.org/package=cluster>. Access March 10, 2013.

Marhfour, I.; Lopez, X.M.; Lefkaditis, D. et al. (2012) Expression of endoplasmic reticulum stress markers in the islets of patients with type 1 diabetes. **Diabetologia** 55:2417-2420.

Martin, J.; Bryar, P.; Mets, M. et al. (2013) Differentially expressed miRNAs in retinoblastoma. **Gene** 512:294-299.

Martinon, F. (2010) Signaling by ROS drives inflammasome activation. **Eur J Immunol** 40:616-619.

Martinon, F.; Glimcher, L.H. (2011) Regulation of innate immunity by signaling pathways emerging from the endoplasmic reticulum. **Curr Opin Immunol** 23:35-40.

Mashima, T.; Udagawa, S.; Tsuruo, T. (2001) Involvement of transcriptional repressor ATF3 in acceleration of caspase protease activation during DNA damaging agent-induced apoptosis. **J Cell Physiol** 188:352-358.

Mathis, D.; Vence, L.; Benoist, C. (2001) beta-Cell death during progression to diabetes. **Nature** 414:792-798.

Mathonnet, G.; Fabian, M.R.; Svitkin, Y.V. et al. (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. **Science** 317:1764-1767.

Matteucci, E.; Giampietro, O. (2000) Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients. **Diabetes Care** 23:1182-1186.

Meier, J.J.; Lin, J.C.; Butler, A.E. et al. (2006) Direct evidence of attempted beta cell regeneration in an 89-year-old patient with recent-onset type 1 diabetes. **Diabetologia** 49:1838-1844.

Meister, G.; Landthaler, M.; Patkaniowska, A. et al. (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. **Mol Cell** 15:185-197.

Millet, I.; Wong, F.S.; Gurr, W. et al. (2006) Targeted expression of the anti-apoptotic gene CrmA to NOD pancreatic islets protects from autoimmune diabetes. **J Autoimmun** 26:7-15.

Moreno-Moya, J.M.; Vilella, F.; Simon, C. (2014) MicroRNA: key gene expression regulators. **Fertil Steril** 101:1516-1523.

Murata, Y.; Shimamura, T.; Hamuro, J. (2002) The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. **Int Immunol** 14:201-212.

Nathan, C.; Cunningham-Bussel, A. (2013) Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. **Nat Rev Immunol** 13:349-361.

Nathan, D.M.; Turgeon, H.; Regan, S. (2007) Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. **Diabetologia** 50:2239-2244.

Nielsen, C.B.; Shomron, N.; Sandberg, R. et al. (2007) Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. **RNA** 13:1894-1910.

Nielsen, L.B.; Wang, C.; Sorensen, K. et al. (2012) Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression. **Exp Diabetes Res** 2012:896362.

Niepmann, M. (2009) Activation of hepatitis C virus translation by a liver-specific microRNA. **Cell Cycle** 8:1473-1477.

Nistico, L.; Buzzetti, R.; Pritchard, L.E. et al. (1996) The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. **Hum Mol Genet** 5:1075-1080.

Noble, J.A.; Erlich, H.A. (2012) Genetics of type 1 diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2:a007732.

Norbury, C.J.; Hickson, I.D. (2001) Cellular responses to DNA damage. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 41:367-401.

Nottrott, S.; Simard, M.J.; Richter, J.D. (2006) Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. **Nat Struct Mol Biol** 13:1108-1114.

Okada, C.; Yamashita, E.; Lee, S.J. et al. (2009) A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. **Science** 326:1275-1279.

Okamura, K.; Hagen, J.W.; Duan, H. et al. (2007) The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. **Cell** 130:89-100.

Okamura, K.; Ishizuka, A.; Siomi, H.; Siomi, M.C. (2004) Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. **Genes Dev** 18:1655-1666.

Okamura, K.; Phillips, M.D.; Tyler, D.M. et al. (2008) The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. **Nat Struct Mol Biol** 15:354-363.

Oldham, M.C.; Konopka, G.; Iwamoto, K. et al. (2008) Functional organization of the transcriptome in human brain. **Nat Neurosci** 11:1271-1282.

Oliveros, J.C. (2007) VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams.

Olsen, P.H.; Ambros, V. (1999) The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. **Dev Biol** 216:671-680.

Onengut-Gumuscu, S.; Concannon, P. (2006) Recent advances in the immunogenetics of human type 1 diabetes. **Curr Opin Immunol** 18:634-638.

Opipari, A.W., Jr.; Boguski, M.S.; Dixit, V.M. (1990) The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. **J Biol Chem** 265:14705-14708.

Opipari, A.W., Jr.; Hu, H.M.; Yabkowitz, R.; Dixit, V.M. (1992) The A20 zinc finger protein protects cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. **J Biol Chem** 267:12424-12427.

Orom, U.A.; Nielsen, F.C.; Lund, A.H. (2008) MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. **Mol Cell** 30:460-471.

Osipova, J.; Fischer, D.C.; Dangwal, S. et al. (2014) Diabetes-associated microRNAs in pediatric patients with type 1 diabetes mellitus: a cross-sectional cohort study. **J Clin Endocrinol Metab** 99:E1661-1665.

Padgett, L.E.; Broniowska, K.A.; Hansen, P.A. et al. (2013) The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. **Ann N Y Acad Sci** 1281:16-35.

Padmos, R.C.; Schloot, N.C.; Beyan, H. et al. (2008) Distinct monocyte gene-expression profiles in autoimmune diabetes. **Diabetes** 57:2768-2773.

Pasquinelli, A.E. (2012) MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. **Nat Rev Genet** 13:271-282.

Patterson, C.C.; Dahlquist, G.G.; Gyurus, E. et al. (2009) Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. **Lancet** 373:2027-2033.

Peters, L.; Meister, G. (2007) Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. **Mol Cell** 26:611-623.

Petersen, C.P.; Bordeleau, M.E.; Pelletier, J.; Sharp, P.A. (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. **Mol Cell** 21:533-542.

Pillai, R.S.; Bhattacharyya, S.N.; Artus, C.G. et al. (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. **Science** 309:1573-1576.

Podack, E.R.; Lowrey, D.M.; Lichtenheld, M.; Hameed, A. (1988) Function of granule perforin and esterases in T cell-mediated reactions. Components required for delivery of molecules to target cells. **Ann N Y Acad Sci** 532:292-302.

Pugliese, A. (2012) The multiple origins of Type 1 diabetes. **Diabet Med** 30:135-146.

Pugliese, A.; Zeller, M.; Fernandez, A., Jr. et al. (1997) The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDMM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. **Nat Genet** 15:293-297.

R Development Core Team. (2006) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.

Rains, J.L.; Jain, S.K. (2011) Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radic Biol Med** 50:567-575.

Rana, T.M. (2007) Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8:23-36.

Rassi, D.M.; Junta, C.M.; Fachin, A.L. et al. (2006) Metabolism genes are among the differentially expressed ones observed in lymphomononuclear cells of recently diagnosed type 1 diabetes mellitus patients. **Ann N Y Acad Sci** 1079:171-176.

Reczko, M.; Maragkakis, M.; Alexiou, P. et al. (2012) Functional microRNA targets in protein coding sequences. **Bioinformatics** 28:771-776.

Rehmsmeier, M.; Steffen, P.; Hochsmann, M.; Giegerich, R. (2004) Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. **RNA** 10:1507-1517.

Rigoutsos, I. (2009) New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. **Cancer Res** 69:3245-3248.

Riley, T.; Sontag, E.; Chen, P.; Levine, A. (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nat Rev Mol Cell Biol** 9:402-412.

Robertson, R.P.; Harmon, J.S. (2007) Pancreatic islet beta-cell and oxidative stress: the importance of glutathione peroxidase. **FEBS Lett** 581:3743-3748.

Ruby, J.G.; Jan, C.; Player, C. et al. (2006) Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. **Cell** 127:1193-1207.

Ruby, J.G.; Jan, C.H.; Bartel, D.P. (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. **Nature** 448:83-86.

Ruiz-Garcia, A.; Monsalve, E.; Novellademunt, L. et al. (2011) Cooperation of adenosine with macrophage Toll-4 receptor agonists leads to increased glycolytic flux through the enhanced expression of PFKFB3 gene. **J Biol Chem** 286:19247-19258.

Russo, M.T.; De Luca, G.; Degan, P.; Bignami, M. (2007) Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine. **Mutat Res** 614:69-76.

Salas-Perez, F.; Codner, E.; Valencia, E. et al. (2013) MicroRNAs miR-21a and miR-93 are down regulated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with type 1 diabetes. **Immunobiology** 218:733-737.

Santamaria, P. (2003) Effector lymphocytes in islet cell autoimmunity. **Rev Endocr Metab Disord** 4:271-280.

Savinov, A.Y.; Tcherepanov, A.; Green, E.A. et al. (2003) Contribution of Fas to diabetes development. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100:628-632.

Schwarz, D.S.; Hutvagner, G.; Du, T. et al. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell** 115:199-208.

Sebastiani, G.; Grieco, F.A.; Spagnuolo, I. et al. (2011) Increased expression of microRNA miR-326 in type 1 diabetic patients with ongoing islet autoimmunity. **Diabetes Metab Res Rev** 27:862-866.

Sharp, C.D.; Huang, M.; Glawe, J. et al. (2008) Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 stimulates chemorepulsion of NOD/LtJ T-cell adhesion to islet microvascular endothelium. **Diabetes** 57:102-112.

Shu, X.; Ji, J.; Li, X. et al. (2010) Cancer risk among patients hospitalized for Type 1 diabetes mellitus: a population-based cohort study in Sweden. **Diabet Med** 27:791-797.

Sing, T.; Sander, O.; Beerenwinkel, N.; Lengauer, T. (2005) ROCr: visualizing classifier performance in R. **Bioinformatics** 21:3940-3941. <http://rocr.bioinf.mpi-sb.mpg.de/>.

Smith, W.L.; Garavito, R.M.; DeWitt, D.L. (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **J Biol Chem** 271:33157-33160.

SOURCE (2000). Em <http://puma.princeton.edu/cgi-bin/source/sourceResult>.

Souza, K.L.; Elsner, M.; Mathias, P.C. et al. (2004) Cytokines activate genes of the endocytotic pathway in insulin-producing RINm5F cells. **Diabetologia** 47:1292-1302.

Stark, A.; Brennecke, J.; Russell, R.B.; Cohen, S.M. (2003) Identification of Drosophila MicroRNA targets. **PLoS Biol** 1:E60.

Storr, S.J.; Woolston, C.M.; Zhang, Y.; Martin, S.G. (2013) Redox environment, free radical, and oxidative DNA damage. **Antioxid Redox Signal** 18:2399-2408.

Sun, H.; Charles, C.H.; Lau, L.F.; Tonks, N.K. (1993) MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. **Cell** 75:487-493.

Takahashi, P.; Xavier, D.J.; Evangelista, A.F. et al. (2014) MicroRNA expression profiling and functional annotation analysis of their targets in patients with type 1 diabetes mellitus. **Gene** 539:213-223.

Tanaka, Y.; Asakawa, T.; Asagiri, K. et al. (2004) Nesidioblastosis treated successfully by 85% pancreatectomy. **Kurume Med J** 51:99-103.

The Perl Programming Language Acesso 10 de janeiro, 2013, em <http://www.perl.org>.

Thermann, R.; Hentze, M.W. (2007) Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. **Nature** 447:875-878.

Thomson, D.W.; Bracken, C.P.; Goodall, G.J. (2011) Experimental strategies for microRNA target identification. **Nucleic Acids Res** 39:6845-6853.

Tolia, N.H.; Joshua-Tor, L. (2007) Slicer and the argonautes. **Nat Chem Biol** 3:36-43.

Tonooka, N.; Oseid, E.; Zhou, H. et al. (2007) Glutathione peroxidase protein expression and activity in human islets isolated for transplantation. **Clin Transplant** 21:767-772.

Torres, M.; Forman, H.J. (2003) Redox signaling and the MAP kinase pathways. **Biofactors** 17:287-296.

Ul Hussain, M. (2012) Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. **Cell Tissue Res** 349:405-413.

Vafiadis, P.; Bennett, S.T.; Todd, J.A. et al. (1997) Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. **Nat Genet** 15:289-292.

Valeri, N.; Gasparini, P.; Fabbri, M. et al. (2010) Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107:6982-6987.

Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M. et al. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol Cell Biochem** 266:37-56.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J. et al. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol** 39:44-84.

van Belle, T.L.; Coppieters, K.T.; von Herrath, M.G. (2011) Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiol Rev** 91:79-118.

van Loon, B.; Markkanen, E.; Hubscher, U. (2010) Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. **DNA Repair (Amst)** 9:604-616.

van Oostrom, O.; de Kleijn, D.P.; Fledderus, J.O. et al. (2009) Folic acid supplementation normalizes the endothelial progenitor cell transcriptome of patients with type 1 diabetes: a case-control pilot study. **Cardiovasc Diabetol** 8:47.

Vasudevan, S.; Tong, Y.; Steitz, J.A. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. **Science** 318:1931-1934.

Vasudevan, S.; Tong, Y.; Steitz, J.A. (2008) Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. **Cell Cycle** 7:1545-1549.

Vaz, C.; Ahmad, H.M.; Sharma, P. et al. (2010) Analysis of microRNA transcriptome by deep sequencing of small RNA libraries of peripheral blood. **BMC Genomics** 11:288.

Vazquez, A.; Bond, E.E.; Levine, A.J.; Bond, G.L. (2008) The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. **Nat Rev Drug Discov** 7:979-987.

Vincent, A.M.; Olzmann, J.A.; Brownlee, M. et al. (2004) Uncoupling proteins prevent glucose-induced neuronal oxidative stress and programmed cell death. **Diabetes** 53:726-734.

Wakiyama, M.; Takimoto, K.; Ohara, O.; Yokoyama, S. (2007) Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. **Genes Dev** 21:1857-1862.

Wang, B.; Love, T.M.; Call, M.E. et al. (2006) Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. **Mol Cell** 22:553-560.

Wang, B.; Yanez, A.; Novina, C.D. (2008a) MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105:5343-5348.

Wang, M.Y.; Yu, X.; Lee, Y. et al. (2013) Iatrogenic hyperinsulinemia in type 1 diabetes: its effect on atherogenic risk markers. **J Diabetes Complications** 27:70-74.

Wang, X.; Jia, S.; Geoffrey, R. et al. (2008b) Identification of a molecular signature in human type 1 diabetes mellitus using serum and functional genomics. **J Immunol** 180:1929-1937.

Warnes, G.R.; Bolker, B.; Bonebakker, L. et al. (2013) Various R programming tools for plotting data, version 2.11.0.1. <http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>. Access April 10, 2013.

Wenzlau, J.M.; Juhl, K.; Yu, L. et al. (2007) The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104:17040-17045.

Westbrook, A.M.; Wei, B.; Braun, J.; Schiestl, R.H. (2009) Intestinal mucosal inflammation leads to systemic genotoxicity in mice. **Cancer Res** 69:4827-4834.

Wideroff, L.; Gridley, G.; Møller, L. et al. (1997) Cancer incidence in a population-based cohort of patients hospitalized with diabetes mellitus in Denmark. **J Natl Cancer Inst** 89:1360-1365.

Wightman, B.; Ha, I.; Ruvkun, G. (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell** 75:855-862.

Willcox, A.; Richardson, S.J.; Bone, A.J. et al. (2009) Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. **Clin Exp Immunol** 155:173-181.

Winter, J.; Jung, S.; Keller, S. et al. (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nat Cell Biol** 11:228-234.

Zendehdel, K.; Nyren, O.; Ostenson, C.G. et al. (2003) Cancer incidence in patients with type 1 diabetes mellitus: a population-based cohort study in Sweden. **J Natl Cancer Inst** 95:1797-1800.

Zeng, Y.; Cullen, B.R. (2004) Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. **Nucleic Acids Res** 32:4776-4785.

Zeng, Y.; Cullen, B.R. (2005) Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. **J Biol Chem** 280:27595-27603.

Zhang, B.; Pan, X.; Cobb, G.P.; Anderson, T.A. (2007) microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Dev Biol** 302:1-12.

Zhang, J.; Liu, Y.; Liu, Z. et al. (2013) Differential expression profiling and functional analysis of microRNAs through stage I-III papillary thyroid carcinoma. **Int J Med Sci** 10:585-592.

Zhong, J.; Rao, X.; Xu, J.F. et al. (2012) The role of endoplasmic reticulum stress in autoimmune-mediated beta-cell destruction in type 1 diabetes. **Exp Diabetes Res** 2012:238980.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos pacientes DM1**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 633-1000 - Fax: 633-1144
CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTES

NOME DA PESQUISA: REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO DE DANO OXIDATIVO NO DNA POR microRNAs EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO-1.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Paula Takahashi

ENDEREÇO PARA CONTATO : Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14049-900

Laboratório de Citogenética e Mutagenese, Bloco G

Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

Telefone : (16) 3602-3082

Convidamos o senhor (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado: REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO DE DANO OXIDATIVO NO DNA POR microRNAs EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO-1.

A pesquisa será realizada pela bióloga pós-graduanda em nível de doutorado, Paula Takahashi, aluna do Departamento de Genética, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, que realizará um estudo sobre o diabetes. Diabetes Mellitus é uma doença que afeta milhões de pessoas não somente no Brasil, mas em todo o mundo. Esta doença é caracterizada por hiperglicemia, ou seja, altos níveis de açúcar no sangue, acima dos níveis normais. Neste trabalho, queremos estudar sob o aspecto genético, quais fatores estão envolvidos no desenvolvimento e progressão do diabetes. As células presentes no sangue colhido serão submetidas a uma série de análises, sendo necessário comparar os pacientes diabéticos com indivíduos sadios não-diabéticos. Assim, esperamos conseguir resultados que possam nos ajudar a compreender melhor essa doença e, no futuro, juntamente com informações de outras pesquisas, poderá contribuir para melhorar o tratamento, ou mesmo para prevenir a doença.

Assim, caso concorde em participar da nossa pesquisa, faz-se necessária a coleta de 20 mL de sangue periférico (o equivalente a duas colheres de sopa), por punção venosa. Portanto, o senhor (a) sofrerá o incômodo de uma picada de agulha, mas não haverá risco à sua saúde. A coleta será realizada por um profissional habilitado e altamente capacitado nessa atividade somente quando o paciente vier ao ambulatório para exames rotineiros solicitados pelo médico responsável. Desta forma, não será feita nenhuma coleta de sangue em outra ocasião. O senhor (a) não terá que realizar nenhum gasto para fazer a coleta de sangue e também não será remunerado (a) pela sua contribuição. Ainda, a pesquisadora declara que não prevê qualquer benefício direto ao paciente com relação à sua participação no estudo. Gostaríamos ainda de esclarecer que, caso seja de nosso interesse realizar outro tipo de estudo com o material doado, o senhor (a) será informado (a) sobre esse novo trabalho e seu material só será utilizado com o seu consentimento.

Serão preservados os direitos do (a) doador (a), conforme seguem:

- 1) A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa e com o tratamento no hospital;
- 2) A liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo em relação ao tratamento;
- 3) A segurança de não ser identificado (a), ou seja, a participação terá o caráter confidencial;
- 4) Receber informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade de continuar participando;
- 5) Todos os exames de sangue serão coletados com total responsabilidade e custo dos pesquisadores. A coleta de sangue será feita com material descartável, sendo necessária apenas uma punção da veia do braço, o que pode, de fato, ser um procedimento desconfortável e impor um risco mínimo, mas apenas pela picada com a agulha;
- 6) Não serão substituídas ou modificadas quaisquer medicações por conta deste estudo, não havendo prejuízos quanto ao tratamento clínico instituído neste ambulatório;
- 7) Pelo fato desta pesquisa não impor risco à saúde dos pacientes, não haverá a necessidade de conceder remuneração ou ressarcimento aos participantes, mas em casos excepcionais, caso o paciente se sinta lesado com o procedimento da coleta de sangue, este poderá requerer os seus direitos de acordo com as leis vigentes no país.
- 8) Caso haja algum gasto adicional, este ocorrerá por conta do pesquisador.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Para esclarecer quaisquer dúvidas, telefonar para (16) 3602-3082 ou 3602-3827 e falar com Paula Takahashi (pós-graduanda) ou com a Prof^a. Dr^a. Elza Tiemi Sakamoto Hojo (orientadora da aluna). Endereço: Departamento de Genética, bloco G, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; Avenida Bandeirantes 3900, 14040-901 Ribeirão Preto, SP.

Eu, _____, portador (a) do R.G. _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações supracitadas, ciente dos meus direitos acima relacionados e diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar da pesquisa.

Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura do (a) doador (a)

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos indivíduos sadios não diabéticos (controles)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 633-1000 - Fax: 633-1144

CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLES

NOME DA PESQUISA: REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO DE DANO OXIDATIVO NO DNA POR microRNAs EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO-1.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Paula Takahashi

ENDEREÇO PARA CONTATO : Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14049-900

Laboratório de Citogenética e Mutagenese, Bloco G

Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

Telefone : (16) 3602-3082

Convidamos o senhor (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado: REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO DE DANO OXIDATIVO NO DNA POR microRNAs EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO-1.

A pesquisa será realizada pela bióloga pós-graduanda em nível de doutorado, Paula Takahashi, aluna do Departamento de Genética, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, que realizará um estudo sobre o diabetes. Diabetes Mellitus é uma doença que afeta milhões de pessoas não somente no Brasil, mas em todo o mundo. Esta doença é caracterizada por hiperglicemia, ou seja, altos níveis de açúcar no sangue, acima dos níveis normais. Neste trabalho, queremos estudar sob o aspecto genético, quais fatores estão envolvidos no desenvolvimento e progressão do diabetes. As células presentes no sangue colhido serão submetidas a uma série de análises, sendo necessário comparar os pacientes diabéticos com indivíduos sadios não-diabéticos. Assim, esperamos conseguir resultados que possam nos ajudar a compreender melhor essa doença e, no futuro, juntamente com informações de outras pesquisas, poderá contribuir para melhorar o tratamento, ou mesmo para prevenir a doença.

Sendo este o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dirigido aos voluntários sadios, a pesquisadora declara que o senhor (a) não terá que realizar nenhum gasto para fazer a coleta de sangue. Ainda, a pesquisadora declara que não prevê qualquer benefício direto ao voluntário com relação à sua participação no estudo, não havendo remuneração pela sua contribuição. Assim, caso concorde em participar da nossa pesquisa, faz-se necessária a coleta de 20 mL de sangue periférico (o equivalente a duas colheres de sopa), por punção venosa, que será feita por um profissional habilitado e altamente capacitado nessa atividade. Portanto, o senhor (a) sofrerá o incômodo de uma picada de agulha, mas não haverá risco à sua saúde. Gostaríamos ainda de esclarecer que, caso seja de nosso interesse realizar outro tipo de estudo com o material doado, o senhor (a) será informado (a) sobre esse novo trabalho e seu material só será utilizado com o seu consentimento.

Serão preservados os direitos do (a) doador (a), conforme seguem:

- 1) A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa;
- 2) A liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo ou constrangimento;
- 3) A segurança de não ser identificado (a), ou seja, a participação terá o caráter confidencial;
- 4) Receber informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade de continuar participando;
- 5) Todos os exames de sangue serão coletados com total responsabilidade e custo dos pesquisadores. A coleta de sangue será feita com material descartável, sendo necessária apenas uma punção da veia do braço, o que pode ser um procedimento desconfortável e impor um risco mínimo, mas somente devido à picada com a agulha;
- 6) Pelo fato desta pesquisa não impor risco à saúde dos voluntários, não haverá a necessidade de conceder remuneração ou ressarcimento aos participantes, mas em casos excepcionais, caso o (a) doador (a) se sinta lesado (a) com o procedimento da coleta de sangue, este (a) poderá requerer os seus direitos de acordo com as leis vigentes no país.
- 7) Caso haja algum gasto adicional, este ocorrerá por conta do pesquisador.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Para esclarecer quaisquer dúvidas, telefonar para (16) 3602-3082 ou 3602-3827 e falar com Paula Takahashi (pós-graduanda) ou com a Prof^a. Dr^a. Elza Tiemi Sakamoto Hojo (orientadora da aluna). Endereço: Departamento de Genética, bloco G, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; Avenida Bandeirantes 3900, 14040-901 Ribeirão Preto, SP.

Eu, _____, portador (a) do R.G. _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações supracitadas, ciente dos meus direitos acima relacionados e diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar da pesquisa.

Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura do (a) doador (a)

ANEXO C - Aprovação do presente estudo pelo Comitê de Ética do HCFMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 23 de novembro de 2011

Ofício nº 4322/2011
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO DE DANO OXIDATIVO NO DNA POR microRNAs EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO-1”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 337ª Reunião Ordinária realizada em 21/11/2011, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 13314/2011.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

PAULA TAKAHASHI

PROF^a. DR^a. ELZA TIEMI SAKAMOTO HOJO(Orientadora)

Depto. de Genética – FMRP-USP

ANEXO D e ANEXO E - *Boxplots* dos resultados obtidos nos experimentos de microarranjos de microRNAs de todos os indivíduos estudados (pacientes DM1 e controles) antes da normalização (**D**) e após a normalização pelo método quantile (**E**). A parte superior de cada retângulo cinza representa o percentile 75, a parte inferior o percentile 25 e a metade representa o percentile 50 (mediana); as extremidades das barras representam o mínimo e o máximo de todos os dados de expressão; os círculos pretos representam os valores de intensidade de sinal de sondas acima do percentile 75 e abaixo do percentile 25; a escala corresponde aos valores de intensidade dos dados de expressão.

ANEXO F - Vias KEGG significativamente enriquecidas em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle e os microRNAs diferencialmente expressos com valores de AUC $\geq 0,90$ que potencialmente as regulam (Takahashi et al. 2014).

Vias KEGG	microRNAs induzidos
Esclerose lateral amiotrófica (ELA)	hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-101; hsa-miR-195; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-19a; hsa-miR-21; hsa-miR-98; hsa-miR-186; hsa-miR-335; hsa-miR-454; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-15b*; hsa-miR-16; hsa-miR-20b; hsa-miR-32; hsa-miR-126 hsa-miR-338-3p; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-450a; hsa-miR-33a; hsa-miR-18b; hsa-miR-20a*.
Apoptose	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-101; hsa-miR-10a; hsa-miR-19a; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-335; hsa-miR-454; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-32; hsa-miR-126; hsa-miR-450a; hsa-miR-33a.
Orientação de axônio	hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-18b; hsa-miR-33a; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-7; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-19a; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-195; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-32; hsa-miR-335; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-20b; hsa-miR-98; hsa-miR-450a; hsa-miR-424; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-20a*; hsa-miR-126.
Via de sinalização de cálcio	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-33a; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424; hsa-miR-32; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-7; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-450a; hsa-miR-20a*.
Via de sinalização de quimiocinas	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-33a; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424; hsa-miR-32; hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-15b*; hsa-miR-21; hsa-miR-450a; hsa-miR-126.
Endocitose	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-186; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-19a; hsa-miR-32; hsa-miR-101; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-195; hsa-miR-424; hsa-miR-10a; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-20b; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-18b; hsa-miR-33a; hsa-miR-450a; hsa-miR-20a*.
Sinalização celular epitelial em infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	hsa-miR-32; hsa-miR-186; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-26b; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-16; hsa-miR-195; hsa-miR-424; hsa-miR-10a; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-33a; hsa-miR-7; hsa-miR-18b; hsa-miR-27b; hsa-miR-101; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-335; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-21; hsa-miR-98; hsa-miR-450a.
Adesão focal	hsa-miR-19a; hsa-miR-10a; hsa-miR-186; hsa-miR-26b; hsa-miR-548c-3p; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-101; hsa-miR-33a; hsa-miR-21; hsa-miR-32; hsa-miR-126; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-20a*; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-450a.

Vias KEGG	microRNAs induzidos
Junção <i>gap</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-33a; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424; hsa-miR-32; hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-450a; hsa-miR-21; hsa-miR-20a*.
Via de sinalização de GnRH	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-33a; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424; hsa-miR-32; hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-450a; hsa-miR-21; hsa-miR-20a*.
Via de sinalização de Hedgehog	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-98; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-32; hsa-miR-10a; hsa-miR-19a; hsa-miR-27b; hsa-miR-101; hsa-miR-186; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-21; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-195; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-20b; hsa-miR-33a; hsa-miR-26b; hsa-miR-18b; hsa-miR-20a*; hsa-miR-450a.
Via de sinalização da insulina	hsa-miR-195; hsa-miR-16; hsa-miR-424; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-101; hsa-miR-19a; hsa-miR-26b; hsa-miR-335; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-32; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-10a; hsa-miR-33a; hsa-miR-126; hsa-miR-21; hsa-miR-126*; hsa-miR-450a.
Potencialização a longo prazo	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-33a; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424; hsa-miR-26b; hsa-miR-32; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-7; hsa-miR-450a; hsa-miR-21.
Via de sinalização de MAPK	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-186; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-101; hsa-miR-10a; hsa-miR-19a; hsa-miR-32; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-335; hsa-miR-33a; hsa-miR-450a; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-126; hsa-miR-20a*.
Melanogênese	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-33a; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424; hsa-miR-32; hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-450a; hsa-miR-21.
Via de sinalização de neurotrofina	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-101; hsa-miR-10a; hsa-miR-21; hsa-miR-32; hsa-miR-126; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-19a; hsa-miR-26b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-450a; hsa-miR-33a; hsa-miR-20a*; hsa-miR-126*.
Via de sinalização de p53	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-19a; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-186; hsa-miR-335; hsa-miR-454; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-16; hsa-miR-195; hsa-miR-424; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-32; hsa-miR-7; hsa-miR-15b*; hsa-miR-20a*; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-33a; hsa-miR-126.

Vias KEGG	microRNAs induzidos
Vias em câncer	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-186; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-101; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-32; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-10a; hsa-miR-19a; hsa-miR-126; hsa-miR-33a; hsa-miR-450a; hsa-miR-20a*.
Regulação do citoesqueleto de actina	hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-20b; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-32; hsa-miR-101; hsa-miR-195; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-19a; hsa-miR-10a; hsa-miR-186; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-98; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-18b; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-126; hsa-miR-33a; hsa-miR-450a; hsa-miR-15b*; hsa-miR-20a*.
Via de sinalização do receptor de células T	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-101; hsa-miR-33a; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-10a; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-19a; hsa-miR-32; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-335; hsa-miR-26b; hsa-miR-450a; hsa-miR-21; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-126.
Via de sinalização de TGF- β	hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-98; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-186; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-20b; hsa-miR-101; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-32; hsa-miR-19a; hsa-miR-33a; hsa-miR-18b.
Via de sinalização de Wnt	hsa-miR-27b; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-16; hsa-miR-98; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-101; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-7; hsa-miR-10a; hsa-miR-26b; hsa-miR-32; hsa-miR-33a; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-450a; hsa-miR-20b; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-20a*; hsa-miR-21; hsa-miR-542-3p.
Vias KEGG	microRNAs reprimidos
Junção aderente	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940; hsa-miR-140-3p; hsa-miR-1275.
Apoptose	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940; hsa-miR-1275; hsa-miR-140-3p; hsa-miR-324-5p.
Orientação de axônio	hsa-miR-324-5p; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-940; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-140-3p.
Via de sinalização de quimiocinas	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940; hsa-miR-140-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-1275; hsa-miR-324-5p.
Endocitose	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-940; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-140-3p; hsa-miR-1275.
Adesão focal	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940; hsa-miR-1275; hsa-miR-140-3p.
Via de sinalização da insulina	hsa-miR-423-5p; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-940; hsa-miR-1275; hsa-miR-140-3p.
Melanogênese	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940; hsa-miR-140-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-1275.

Vias KEGG	microRNAs reprimidos
Sinalização de Notch	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-940; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-1275; hsa-miR-342-5p.
Via de sinalização de p53	hsa-miR-766; hsa-miR-940; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-140-3p; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-342-5p.
Vias em câncer	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-940; hsa-miR-1275; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-140-3p.
Via de sinalização de Wnt	hsa-miR-324-5p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940; hsa-miR-140-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-1275.

ANEXO G e ANEXO H - *Boxplots* dos resultados obtidos nos experimentos de microarranjos de mRNAs de todos os indivíduos estudados (pacientes DM1 e controles) antes da normalização (**A**) e após a normalização pelo método quantile (**B**). A parte superior de cada retângulo cinza representa o percentile 75, a parte inferior o percentile 25 e a linha no meio representa o percentile 50 (mediana); as extremidades das barras representam o mínimo e o máximo de todos os dados de expressão; os círculos pretos representam os valores de intensidade de sinal de sondas acima do percentile 75; a escala corresponde aos valores de intensidade dos dados de expressão.

ANEXO I - Gráfico da PCA exibindo a distribuição espacial dos pacientes DM1 (alaranjado) e dos indivíduos controles (vermelho) referente aos dados normalizados de mRNA após terem sido ajustados pelo método Bayes empírico (método de microarranjos).

ANEXO J - Genes diferencialmente expressos em PBMCs de pacientes DM1 comparados ao grupo controle obtidos nos experimentos de microarranjos de mRNAs. PFP, porcentagem de falsos-positivos.

Genes	Fold change	PFP	Valor de p
<i>A_24_P177553</i>	1,20	3,34E-02	4,00E-04
<i>A_24_P289043</i>	1,19	4,61E-02	6,00E-04
<i>A_24_P306469</i>	1,19	2,74E-02	3,00E-04
<i>A_24_P307306</i>	1,16	1,74E-02	2,00E-04
<i>A_24_P49597</i>	0,87	1,30E-03	0,00E+00
<i>A_24_P662366</i>	1,26	2,80E-03	0,00E+00
<i>A_24_P92267</i>	1,15	3,68E-02	4,00E-04
<i>ACBD4</i>	1,26	0,00E+00	0,00E+00
<i>ACBD5</i>	1,22	1,46E-02	1,00E-04
<i>ADM</i>	1,20	2,80E-03	0,00E+00
<i>ALAS2</i>	1,13	0,00E+00	0,00E+00
<i>ANXA3</i>	1,15	4,90E-03	0,00E+00
<i>APOBEC3A</i>	1,22	7,00E-04	0,00E+00
<i>APOBEC3B</i>	1,13	3,66E-02	4,00E-04
<i>APOL6</i>	1,17	1,80E-03	0,00E+00
<i>AQP9</i>	1,09	2,12E-02	2,00E-04
<i>AREG</i>	1,42	0,00E+00	0,00E+00
<i>ARL5B</i>	1,15	4,29E-02	5,00E-04
<i>ATF3</i>	1,40	3,40E-03	5,00E-05
<i>B3GAT1</i>	1,22	0,00E+00	0,00E+00
<i>BAMBI</i>	1,19	2,85E-02	3,00E-04
<i>BC137009</i>	1,11	2,52E-02	3,00E-04
<i>BCL2A1</i>	1,27	3,00E-04	0,00E+00
<i>BFSP1</i>	1,18	3,15E-02	4,00E-04
<i>C11orf96</i>	1,26	1,20E-03	0,00E+00
<i>C14orf181</i>	1,22	1,79E-02	2,00E-04
<i>C15orf38</i>	0,88	2,70E-02	1,00E-04
<i>C15orf48</i>	1,32	0,00E+00	0,00E+00
<i>C17orf87</i>	1,08	0,00E+00	0,00E+00
<i>C17orf91</i>	1,16	1,92E-02	2,00E-04
<i>C19orf33</i>	0,84	2,72E-02	1,00E-04
<i>C1orf229</i>	1,01	4,02E-02	5,00E-04
<i>C21orf7</i>	1,29	1,50E-03	0,00E+00
<i>C7orf16</i>	1,35	0,00E+00	0,00E+00
<i>CA6</i>	1,18	2,28E-02	2,00E-04
<i>CACNG6</i>	0,83	1,03E-02	0,00E+00
<i>CAMP</i>	0,97	5,40E-03	0,00E+00
<i>CCL2</i>	1,18	3,69E-02	4,00E-04
<i>CCL20</i>	1,70	7,00E-04	0,00E+00
<i>CCL3L3</i>	2,69	1,34E-02	5,00E-05
<i>CCL4</i>	1,75	0,00E+00	0,00E+00
<i>CCR2</i>	0,80	4,57E-02	2,00E-04

<i>CCRL2</i>	1,29	5,00E-04	0,00E+00
<i>CD69</i>	1,14	3,16E-02	4,00E-04
<i>CD83</i>	1,75	0,00E+00	0,00E+00
<i>CD8B</i>	1,15	1,27E-02	1,00E-04
<i>CDC42EP2</i>	1,23	4,60E-03	0,00E+00
<i>CDKN1C</i>	1,16	2,36E-02	3,00E-04
<i>CEACAM8</i>	0,94	6,90E-03	5,00E-05
<i>CENPK</i>	1,19	1,50E-03	0,00E+00
<i>CES1</i>	0,84	1,50E-03	0,00E+00
<i>CHI3L1</i>	0,89	2,96E-02	1,00E-04
<i>CISH</i>	0,91	1,93E-02	2,00E-04
<i>CLC</i>	0,76	1,20E-03	0,00E+00
<i>CLEC4G</i>	0,92	2,90E-02	1,00E-04
<i>CLEC4M</i>	1,14	1,88E-02	2,00E-04
<i>CNN1</i>	1,05	1,42E-02	1,00E-04
<i>CPA3</i>	0,84	4,06E-02	1,00E-04
<i>CSRNP1</i>	1,24	1,24E-02	1,00E-04
<i>CTSG</i>	1,12	1,28E-02	5,00E-05
<i>CXCL1</i>	1,66	0,00E+00	0,00E+00
<i>CXCL10</i>	1,26	5,00E-04	0,00E+00
<i>CXCL2</i>	2,22	0,00E+00	0,00E+00
<i>CXCL3</i>	1,98	0,00E+00	0,00E+00
<i>CYB5R2</i>	1,05	4,71E-02	6,00E-04
<i>CYorf15A</i>	1,30	2,06E-02	5,00E-05
<i>CYorf15B</i>	1,22	2,05E-02	5,00E-05
<i>DACT1</i>	0,93	4,64E-02	2,00E-04
<i>DDIT4</i>	1,16	1,27E-02	1,00E-04
<i>DDX3Y</i>	1,19	6,00E-04	0,00E+00
<i>DDX43</i>	1,09	2,83E-02	3,00E-04
<i>DEFA3</i>	0,93	1,45E-03	0,00E+00
<i>DEFA4</i>	0,94	8,50E-04	0,00E+00
<i>DEFB1</i>	0,89	4,96E-02	2,00E-04
<i>DIRC1</i>	1,18	7,00E-04	0,00E+00
<i>DOCK3</i>	1,26	8,00E-04	0,00E+00
<i>DPYSL4</i>	0,87	4,12E-02	1,00E-04
<i>DSP</i>	1,10	0,00E+00	0,00E+00
<i>DUSP1</i>	1,43	0,00E+00	0,00E+00
<i>DUSP2</i>	1,38	0,00E+00	0,00E+00
<i>EGR1</i>	1,38	0,00E+00	0,00E+00
<i>EGR2</i>	1,19	1,55E-02	5,00E-05
<i>EGR3</i>	1,27	5,00E-04	0,00E+00
<i>EIF1AY</i>	1,32	0,00E+00	0,00E+00
<i>EMP1</i>	1,19	2,79E-02	3,00E-04
<i>ENC1</i>	1,28	7,10E-03	1,00E-04
<i>ENST00000082259</i>	1,18	3,08E-02	4,00E-04
<i>ENST00000190839</i>	1,05	4,50E-03	0,00E+00

<i>ENST00000309874</i>	1,06	2,06E-02	2,00E-04
<i>ENST00000326989</i>	1,17	1,18E-02	1,00E-04
<i>ENST00000354689</i>	1,20	1,58E-02	2,00E-04
<i>ENST00000369123</i>	0,90	2,26E-02	2,50E-04
<i>ENST00000374057</i>	1,26	5,00E-04	0,00E+00
<i>ENST00000379350</i>	1,13	7,00E-03	1,00E-04
<i>ENST00000390539</i>	1,27	0,00E+00	0,00E+00
<i>ENST00000390549</i>	1,27	5,00E-04	0,00E+00
<i>ENST00000390625</i>	1,30	3,60E-03	0,00E+00
<i>ENST00000415386</i>	1,04	2,00E-03	0,00E+00
<i>ENST00000450856</i>	1,38	7,00E-04	0,00E+00
<i>ENST00000453166</i>	1,22	7,10E-03	1,00E-04
<i>ENST00000469435</i>	1,19	1,75E-02	2,00E-04
<i>ERAP1</i>	1,12	2,23E-02	2,00E-04
<i>ERAP2</i>	1,11	2,30E-03	0,00E+00
<i>EREG</i>	1,35	0,00E+00	0,00E+00
<i>FAM118A</i>	0,87	2,53E-02	3,00E-04
<i>FCGR1B</i>	1,14	1,75E-02	2,00E-04
<i>FCRL5</i>	1,13	7,00E-04	0,00E+00
<i>FFAR2</i>	1,40	0,00E+00	0,00E+00
<i>FGFBP2</i>	1,25	7,00E-04	0,00E+00
<i>FHL2</i>	1,24	5,40E-03	0,00E+00
<i>FOLR3</i>	0,86	2,50E-03	0,00E+00
<i>FOS</i>	1,12	2,80E-03	0,00E+00
<i>FOSB</i>	1,43	0,00E+00	0,00E+00
<i>FOXB1</i>	1,25	3,00E-04	0,00E+00
<i>G0S2</i>	2,03	0,00E+00	0,00E+00
<i>GADD45B</i>	1,25	3,60E-03	0,00E+00
<i>GBP1</i>	1,15	3,09E-02	4,00E-04
<i>GNBP1</i>	0,81	2,60E-03	0,00E+00
<i>GOLGA6L6</i>	1,31	0,00E+00	0,00E+00
<i>GPR109B</i>	1,42	0,00E+00	0,00E+00
<i>GPR56</i>	1,16	7,10E-03	1,00E-04
<i>GPR84</i>	1,13	1,13E-02	1,00E-04
<i>GSTT1</i>	1,01	1,23E-02	1,00E-04
<i>GZMB</i>	1,22	5,40E-03	0,00E+00
<i>GZMH</i>	1,16	1,60E-03	0,00E+00
<i>HAGHL</i>	1,17	7,00E-03	1,00E-04
<i>HBA2</i>	0,89	1,18E-02	1,00E-04
<i>HBD</i>	1,05	2,50E-03	0,00E+00
<i>HBEGF</i>	1,21	2,30E-03	0,00E+00
<i>HBG1</i>	1,36	2,04E-02	5,00E-05
<i>HKDC1</i>	0,82	4,92E-02	2,00E-04
<i>HLA-DQA2</i>	1,13	1,04E-02	0,00E+00
<i>HLA-DQB1</i>	0,90	5,80E-03	5,00E-05
<i>HLA-DRB6</i>	1,85	0,00E+00	0,00E+00

<i>HP</i>	1,12	5,00E-04	0,00E+00
<i>HRASLS2</i>	1,22	1,13E-02	1,00E-04
<i>HSPB9</i>	1,24	4,60E-03	0,00E+00
<i>ICAM1</i>	1,38	0,00E+00	0,00E+00
<i>ID1</i>	1,44	0,00E+00	0,00E+00
<i>IER2</i>	1,27	1,17E-02	1,00E-04
<i>IER3</i>	1,51	0,00E+00	0,00E+00
<i>IFNG</i>	1,17	2,87E-02	3,00E-04
<i>IGJ</i>	1,30	1,00E-03	0,00E+00
<i>IL1A</i>	1,49	8,50E-04	0,00E+00
<i>IL1B</i>	2,60	0,00E+00	0,00E+00
<i>IL23A</i>	1,19	1,20E-03	0,00E+00
<i>IL4</i>	0,82	1,08E-02	0,00E+00
<i>IL6</i>	1,37	4,00E-04	0,00E+00
<i>IL8</i>	1,99	0,00E+00	0,00E+00
<i>ITGAD</i>	1,14	6,10E-03	0,00E+00
<i>JUNB</i>	1,15	2,24E-02	2,00E-04
<i>KANK1</i>	0,92	4,16E-02	1,00E-04
<i>KCNJ2</i>	1,41	1,37E-02	5,00E-05
<i>KDM5D</i>	1,36	2,08E-02	5,00E-05
<i>KIF19</i>	1,30	0,00E+00	0,00E+00
<i>KIR2DS2</i>	1,06	3,42E-02	4,00E-04
<i>KRT72</i>	0,98	3,62E-02	4,00E-04
<i>KRTAP1-3</i>	1,16	1,70E-02	2,00E-04
<i>LAIR2</i>	0,98	2,15E-03	0,00E+00
<i>LDLR</i>	1,21	1,93E-02	2,00E-04
<i>LGALS2</i>	0,93	4,71E-02	2,00E-04
<i>LILRB5</i>	0,95	7,70E-03	1,00E-04
<i>LOC100131138</i>	1,17	0,00E+00	0,00E+00
<i>LOC100170939</i>	0,79	6,60E-03	0,00E+00
<i>LOC100508964</i>	1,10	2,05E-02	2,00E-04
<i>LOC253039</i>	1,15	1,17E-02	1,00E-04
<i>LOC654433</i>	1,04	2,16E-02	5,00E-05
<i>LOC728715</i>	1,01	4,02E-02	5,00E-04
<i>LPL</i>	1,31	1,10E-03	0,00E+00
<i>LRRN3</i>	0,80	1,00E-02	0,00E+00
<i>LTF</i>	0,97	6,55E-03	5,00E-05
<i>MAB21L2</i>	1,18	0,00E+00	0,00E+00
<i>MAFB</i>	1,16	2,87E-02	3,00E-04
<i>MAFF</i>	1,22	2,15E-02	2,00E-04
<i>MAPK8IP1</i>	0,89	6,10E-03	0,00E+00
<i>MARCKS</i>	1,27	2,00E-03	0,00E+00
<i>MARCO</i>	0,75	1,00E-03	0,00E+00
<i>MDGA1</i>	0,75	0,00E+00	0,00E+00
<i>METRNL</i>	1,26	1,60E-03	0,00E+00
<i>MIAT</i>	1,21	4,90E-03	0,00E+00

<i>MME</i>	0,91	4,54E-02	2,00E-04
<i>MMP17</i>	1,14	3,67E-02	4,00E-04
<i>MOP-1</i>	1,40	0,00E+00	0,00E+00
<i>MT1M</i>	1,22	1,31E-02	1,00E-04
<i>MYL9</i>	0,90	4,88E-02	2,00E-04
<i>MYOM2</i>	0,87	0,00E+00	0,00E+00
<i>NCRNA00185</i>	1,13	5,00E-04	0,00E+00
<i>ND6</i>	1,19	1,27E-02	1,00E-04
<i>NEBL</i>	1,05	2,15E-02	2,00E-04
<i>NFKBIA</i>	1,58	0,00E+00	0,00E+00
<i>NFKBIZ</i>	1,39	0,00E+00	0,00E+00
<i>NGFRAP1</i>	1,20	4,59E-02	6,00E-04
<i>NKX1-2</i>	1,17	7,70E-03	1,00E-04
<i>NLRP3</i>	1,07	4,40E-02	6,00E-04
<i>NR4A2</i>	1,30	7,00E-04	0,00E+00
<i>NR4A3</i>	1,19	2,22E-02	2,00E-04
<i>NUAK1</i>	1,07	1,89E-02	2,00E-04
<i>OASL</i>	1,17	1,23E-02	1,00E-04
<i>OLFM4</i>	1,13	1,15E-02	5,00E-05
<i>OLIG1</i>	0,82	1,62E-02	0,00E+00
<i>OSM</i>	1,10	2,80E-03	0,00E+00
<i>PASK</i>	1,15	2,07E-02	2,00E-04
<i>PDGFRB</i>	1,15	1,32E-02	1,00E-04
<i>PDK4</i>	0,82	4,65E-02	2,00E-04
<i>PER1</i>	1,17	2,29E-02	2,00E-04
<i>PF4V1</i>	1,35	0,00E+00	0,00E+00
<i>PFKFB3</i>	1,24	7,00E-04	0,00E+00
<i>PFKL</i>	1,14	3,77E-02	5,00E-04
<i>PHLDA2</i>	1,41	0,00E+00	0,00E+00
<i>PIM3</i>	1,26	8,60E-03	1,00E-04
<i>PLA2G4C</i>	1,17	8,70E-03	1,00E-04
<i>PLAUR</i>	1,12	3,14E-02	4,00E-04
<i>PLEK</i>	1,12	4,67E-02	6,00E-04
<i>PLK2</i>	1,27	6,70E-03	1,00E-04
<i>PNMAL1</i>	1,04	1,21E-02	1,00E-04
<i>PPIF</i>	1,20	2,76E-02	3,00E-04
<i>PPP1R15A</i>	1,49	0,00E+00	0,00E+00
<i>PRF1</i>	1,18	1,40E-02	1,00E-04
<i>PRKY</i>	1,13	4,10E-02	5,00E-04
<i>PROK2</i>	1,11	1,98E-02	2,00E-04
<i>PRSS23</i>	1,20	1,80E-03	0,00E+00
<i>PRSS36</i>	1,26	0,00E+00	0,00E+00
<i>PRUNE2</i>	0,90	4,58E-02	2,00E-04
<i>PSPH</i>	1,21	2,90E-03	0,00E+00
<i>PTGS2</i>	1,57	0,00E+00	0,00E+00
<i>PTX3</i>	1,62	0,00E+00	0,00E+00

<i>PVRL2</i>	1,07	3,71E-02	5,00E-04
<i>PYY2</i>	0,87	2,36E-02	1,00E-04
<i>RAP1GAP2</i>	1,18	1,50E-03	0,00E+00
<i>RASIP1</i>	1,33	8,00E-04	0,00E+00
<i>RBPMS2</i>	0,88	4,02E-02	1,00E-04
<i>RCAN2</i>	1,16	3,15E-02	4,00E-04
<i>RGS1</i>	1,16	4,90E-03	0,00E+00
<i>RPS26</i>	0,89	6,00E-03	0,00E+00
<i>RPS4Y1</i>	1,89	8,50E-04	0,00E+00
<i>RPS4Y2</i>	1,96	7,00E-04	0,00E+00
<i>S100B</i>	1,63	0,00E+00	0,00E+00
<i>S1PR5</i>	1,22	1,14E-02	1,00E-04
<i>SCARF2</i>	1,13	2,15E-02	2,00E-04
<i>SELENBP1</i>	1,15	0,00E+00	0,00E+00
<i>SGK1</i>	1,15	5,40E-03	0,00E+00
<i>SHISA7</i>	1,13	1,24E-02	1,00E-04
<i>SIK1</i>	1,26	1,20E-03	0,00E+00
<i>SLC1A7</i>	1,22	1,00E-03	0,00E+00
<i>SLED1</i>	1,29	0,00E+00	0,00E+00
<i>SMAD1</i>	1,22	2,87E-02	3,00E-04
<i>SNAI1</i>	1,24	7,00E-04	0,00E+00
<i>SOCS3</i>	1,33	0,00E+00	0,00E+00
<i>SPOCD1</i>	1,28	7,00E-04	0,00E+00
<i>SPON2</i>	1,15	3,56E-02	4,00E-04
<i>SYNGR4</i>	1,19	1,00E-03	0,00E+00
<i>TACSTD2</i>	0,76	0,00E+00	0,00E+00
<i>TMEM176A</i>	0,73	1,46E-02	1,50E-04
<i>TMEM176B</i>	0,81	2,70E-03	0,00E+00
<i>TMEM95</i>	0,77	4,83E-02	2,00E-04
<i>TMTC1</i>	0,94	4,90E-02	2,00E-04
<i>TNF</i>	2,30	2,21E-02	5,00E-05
<i>TNFAIP3</i>	1,44	0,00E+00	0,00E+00
<i>TNFAIP6</i>	1,33	1,00E-02	0,00E+00
<i>TNFRSF17</i>	1,33	4,00E-04	0,00E+00
<i>TTY15</i>	1,21	0,00E+00	0,00E+00
<i>TUBB2A</i>	1,08	5,20E-03	0,00E+00
<i>UCP3</i>	0,81	9,70E-03	0,00E+00
<i>UTS2</i>	0,89	4,05E-03	0,00E+00
<i>UTY</i>	1,17	8,00E-04	0,00E+00
<i>VASH1</i>	0,83	4,97E-02	2,00E-04
<i>VIT</i>	1,20	1,46E-02	1,00E-04
<i>VMO1</i>	1,27	1,00E-03	0,00E+00
<i>VSTM2L</i>	0,84	1,80E-03	0,00E+00
<i>WNT2B</i>	0,85	2,71E-02	1,00E-04
<i>XR_041758</i>	1,25	7,00E-03	1,00E-04
<i>XR_079018</i>	1,13	4,24E-02	5,00E-04

ZFP36	1,33	0,00E+00	0,00E+00
ZFP57	0,88	9,10E-03	0,00E+00
ZFY	1,18	0,00E+00	0,00E+00
ZNF205	1,14	7,00E-03	1,00E-04
ZNF843	1,18	1,90E-03	0,00E+00

ANEXO K - Processos biológicos diferencialmente expressos/enriquecidos em PBMCs de pacientes DM1 comparados ao grupo controle obtidos por meio do *BRB-ArrayTools*. CC, componente celular; PB, processo biológico; FM, função molecular. Os processos biológicos de interesse selecionados encontram-se destacados em negrito.

GO	Categoria	Descrição da GO	Número de genes	Valor de p da permutação LS	Valor de p da permutação KS	Valor de p do teste GSA Efron-Tibshirani
GO:0000123	CC	<i>histone acetyltransferase complex</i>	64	0,00099	0,01775	0,145 (+)
GO:0035967	PB	<i>cellular response to topologically incorrect protein</i>	76	0,00144	0,00218	0,023 (+)
GO:0015924	FM	<i>mannosyl-oligosaccharide mannosidase activity</i>	7	0,00156	0,00115	0,012 (-)
GO:0015923	FM	<i>mannosidase activity</i>	11	0,00173	0,00949	0,012 (-)
GO:0032623	PB	<i>interleukin-2 production</i>	38	0,00182	0,00004	0,001 (+)
GO:0032075	PB	<i>positive regulation of nuclease activity</i>	56	0,00183	0,00155	0,001 (+)
GO:0034976	PB	<i>response to endoplasmic reticulum stress</i>	88	0,00189	0,16241	0,029 (-)
GO:0006984	PB	<i>ER-nucleus signaling pathway</i>	81	0,00193	0,00389	0,019 (+)
GO:0004559	FM	<i>alpha-mannosidase activity</i>	10	0,00207	0,00781	0,021 (-)
GO:0032508	PB	<i>DNA duplex unwinding</i>	22	0,00214	0,00005	0,061 (+)
GO:0032663	PB	<i>regulation of interleukin-2 production</i>	34	0,00222	0,0005	< 0,001 (+)
GO:0018393	PB	<i>internal peptidyl-lysine acetylation</i>	92	0,00229	0,08697	0,173 (+)
GO:0030968	PB	<i>endoplasmic reticulum unfolded protein response</i>	72	0,00236	0,00818	0,026 (+)
GO:0034620	PB	<i>cellular response to unfolded protein</i>	72	0,00236	0,00818	0,026 (+)
GO:0005048	FM	<i>signal sequence binding</i>	15	0,00257	0,01827	0,001 (+)
GO:0018394	PB	<i>peptidyl-lysine acetylation</i>	94	0,00278	0,08927	0,17 (+)
GO:0007033	PB	<i>vacuole organization</i>	49	0,00283	0,00117	0,032 (+)
GO:0044380	PB	<i>protein localization to cytoskeleton</i>	6	0,0033	0,00045	0,006 (-)
GO:0042379	FM	<i>chemokine receptor binding</i>	49	0,00348	0,03645	0,004 (+)
GO:0070775	CC	<i>H3 histone acetyltransferase complex</i>	6	0,00366	0,05757	0,088 (+)
GO:0016573	PB	<i>histone acetylation</i>	90	0,00366	0,08448	0,161 (+)
GO:0004402	FM	<i>histone acetyltransferase activity</i>	39	0,00378	0,03139	0,053 (-)
GO:0032392	PB	<i>DNA geometric change</i>	25	0,00389	0,0005	0,125 (+)
GO:0032069	PB	<i>regulation of nuclease activity</i>	61	0,00395	0,03411	0,01 (+)

GO:0006475	PB	<i>internal protein amino acid acetylation</i>	97	0,00398	0,07538	0,186 (+)
GO:0003678	FM	<i>DNA helicase activity</i>	33	0,00423	0,00151	0,131 (+)
GO:0051055	PB	<i>negative regulation of lipid biosynthetic process</i>	25	0,00451	0,02373	0,011 (+)
GO:0045833	PB	<i>negative regulation of lipid metabolic process</i>	38	0,00451	0,08443	0,002 (+)
GO:0008017	FM	<i>microtubule binding</i>	82	0,00468	0,00201	0,009 (-)
GO:0072393	PB	<i>microtubule anchoring at microtubule organizing center</i>	5	0,00553	0,03282	< 0,001 (-)
GO:0090199	PB	<i>regulation of release of cytochrome c from mitochondria</i>	24	0,00596	0,0239	0,003 (+)
GO:0022626	CC	<i>cytosolic ribosome</i>	68	0,0066	0,00384	0,038 (-)
GO:0097190	PB	<i>apoptotic signaling pathway</i>	68	0,00727	0,01973	< 0,001 (+)
GO:1901216	PB	<i>positive regulation of neuron death</i>	28	0,00894	0,13239	< 0,001 (+)
GO:0019908	CC	<i>nuclear cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex</i>	5	0,01192	0,05898	0,002 (-)
GO:0001836	PB	<i>release of cytochrome c from mitochondria</i>	35	0,01415	0,09448	0,004 (+)
GO:0032506	PB	<i>cytokinetic process</i>	6	0,0149	0,00078	< 0,001 (-)
GO:0017069	FM	<i>snRNA binding</i>	14	0,01641	0,00321	0,098 (+)
GO:0010677	PB	<i>negative regulation of cellular carbohydrate metabolic process</i>	16	0,01814	0,05572	0,002 (+)
GO:0030276	FM	<i>clathrin binding</i>	8	0,0183	0,0138	0,004 (-)
GO:0090312	PB	<i>positive regulation of protein deacetylation</i>	10	0,01836	0,01913	0,003 (-)
GO:0001085	FM	<i>RNA polymerase II transcription factor binding</i>	39	0,02052	0,18111	0,001 (-)
GO:0006515	PB	<i>misfolded or incompletely synthesized protein catabolic process</i>	7	0,02454	0,01847	0,004 (-)
GO:0072215	PB	<i>regulation of metanephros development</i>	14	0,02606	0,00028	0,065 (+)
GO:0070567	FM	<i>cytidyltransferase activity</i>	6	0,02648	0,0001	0,013 (+)
GO:0048820	PB	<i>hair follicle maturation</i>	13	0,02726	0,02152	< 0,001 (+)
GO:0033613	FM	<i>activating transcription factor binding</i>	34	0,03362	0,11103	< 0,001 (-)
GO:0044253	PB	<i>positive regulation of multicellular organismal metabolic process</i>	15	0,03454	0,40034	< 0,001 (-)
GO:0009135	PB	<i>purine nucleoside diphosphate metabolic process</i>	5	0,03486	0,04226	0,002 (-)
GO:0009179	PB	<i>purine ribonucleoside diphosphate metabolic process</i>	5	0,03486	0,04226	0,002 (-)
GO:0046031	PB	<i>ADP metabolic process</i>	5	0,03486	0,04226	0,002 (-)
GO:0010340	FM	<i>carboxyl-O-methyltransferase activity</i>	5	0,03523	0,05061	< 0,001 (+)
GO:0051998	FM	<i>protein carboxyl O-methyltransferase activity</i>	5	0,03523	0,05061	< 0,001 (+)
GO:0001562	PB	<i>response to protozoan</i>	8	0,0367	0,05555	0,002 (+)

GO:0031047	PB	<i>gene silencing by RNA</i>	37	0,03785	0,00396	0,162 (-)
GO:0033549	FM	<i>MAP kinase phosphatase activity</i>	14	0,03794	0,13552	0,001 (+)
GO:0008171	FM	<i>O-methyltransferase activity</i>	11	0,03896	0,00164	0,001 (+)
GO:0043044	PB	<i>ATP-dependent chromatin remodeling</i>	24	0,04205	0,00427	0,146 (-)
GO:0016862	FM	<i>intramolecular oxidoreductase activity, interconverting keto- and enol-groups</i>	11	0,04342	0,00228	0,088 (-)
GO:0046838	PB	<i>phosphorylated carbohydrate dephosphorylation</i>	7	0,04541	0,06769	0,001 (-)
GO:0070588	PB	<i>calcium ion transmembrane transport</i>	32	0,05266	0,53295	0,003 (-)
GO:0035195	PB	<i>gene silencing by miRNA</i>	19	0,0596	0,00428	0,133 (+)
GO:0051341	PB	<i>regulation of oxidoreductase activity</i>	52	0,06218	0,02343	< 0,001 (+)
GO:0071545	PB	<i>inositol phosphate catabolic process</i>	8	0,06538	0,169	0,001 (-)
GO:0007253	PB	<i>cytoplasmic sequestering of NF-kappaB</i>	10	0,0659	0,30501	0,004 (+)
GO:0006809	PB	<i>nitric oxide biosynthetic process</i>	38	0,06784	0,00391	0,026 (+)
GO:0046209	PB	<i>nitric oxide metabolic process</i>	44	0,06804	0,00167	0,021 (+)
GO:0030033	PB	<i>microvillus assembly</i>	7	0,06997	0,02769	0,004 (-)
GO:0031063	PB	<i>regulation of histone deacetylation</i>	10	0,06998	0,23074	0,002 (-)
GO:0005149	FM	<i>interleukin-1 receptor binding</i>	10	0,07031	0,00399	0,001 (+)
GO:0043331	PB	<i>response to dsRNA</i>	31	0,07055	0,11695	0,002 (+)
GO:0042094	PB	<i>interleukin-2 biosynthetic process</i>	19	0,07463	0,00451	0,021 (+)
GO:0016471	CC	<i>vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex</i>	10	0,08149	0,31101	0,003 (-)
GO:0006206	PB	<i>pyrimidine nucleobase metabolic process</i>	27	0,08276	0,00351	0,114 (-)
GO:0009185	PB	<i>ribonucleoside diphosphate metabolic process</i>	7	0,08313	0,10214	0,001 (-)
GO:0003339	PB	<i>regulation of mesenchymal to epithelial transition involved in metanephros morphogenesis</i>	5	0,08499	0,00089	0,027 (+)
GO:0032570	PB	<i>response to progesterone stimulus</i>	22	0,09085	0,00291	0,007 (+)
GO:0005637	CC	<i>nuclear inner membrane</i>	26	0,09972	0,39367	0,002 (+)
GO:0033194	PB	<i>response to hydroperoxide</i>	7	0,11274	0,00145	0,071 (-)
GO:0009409	PB	<i>response to cold</i>	25	0,11662	0,17817	0,002 (+)
GO:0018342	PB	<i>protein prenylation</i>	8	0,12377	0,13394	0,004 (-)
GO:0097354	PB	<i>prenylation</i>	8	0,12377	0,13394	0,004 (-)

GO:0071359	PB	<i>cellular response to dsRNA</i>	21	0,12548	0,37257	0,002 (+)
GO:0016722	FM	<i>oxidoreductase activity, oxidizing metal ions</i>	8	0,12651	0,00064	0,027 (-)
GO:0002026	PB	<i>regulation of the force of heart contraction</i>	15	0,14803	0,12805	< 0,001 (+)
GO:0000149	FM	<i>SNARE binding</i>	33	0,19052	0,42141	0,004 (-)
GO:0019905	FM	<i>syntaxin binding</i>	26	0,19875	0,3242	0,004 (-)
GO:2001026	PB	<i>regulation of endothelial cell chemotaxis</i>	5	0,20382	0,17999	0,004 (+)
GO:0080008	CC	<i>Cul4-RING ubiquitin ligase complex</i>	15	0,23394	0,00295	0,294 (-)
GO:0045576	PB	<i>mast cell activation</i>	28	0,25033	0,00439	0,04 (-)
GO:0051213	FM	<i>dioxygenase activity</i>	70	0,42262	0,00182	0,303 (-)
GO:0000724	PB	<i>double-strand break repair via homologous recombination</i>	42	0,47862	0,00475	0,238 (+)
GO:0000725	PB	<i>recombinational repair</i>	42	0,47862	0,00475	0,238 (+)
GO:0016702	FM	<i>oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen, incorporation of two atoms of oxygen</i>	68	0,51001	0,00261	0,362 (-)
GO:0016701	FM	<i>oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen</i>	69	0,53757	0,00217	0,389 (-)

ANEXO L - Genes diferencialmente expressos e os microRNAs diferencialmente expressos, com valores de AUC $\geq 0,90$, (em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle) que potencialmente os regulam (resultados obtidos pela técnica de microarranjos de mRNAs e microRNAs, respectivamente).

Genes	MicroRNAs induzidos	MicroRNAs reprimidos
<i>ACBD5</i>	hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-301a	-
<i>ANXA3</i>	hsa-miR-18b	-
<i>APOBEC3A</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-20b; hsa-miR-548c-3p	-
<i>APOBEC3B</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-548c-3p	-
<i>BAMBI</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-542-3p	-
<i>C14orf181</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-98	-
<i>C15orf48</i>	hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-548c-3p	-
<i>CCL2</i>	hsa-miR-33a; hsa-miR-335	-
<i>CCL20</i>	hsa-miR-19a; hsa-miR-21; hsa-miR-186	-
<i>CCL4</i>	hsa-miR-542-3p	-
<i>CDKN1C</i>	hsa-miR-32	-
<i>CENPK</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-27b; hsa-miR-32; hsa-miR-98; hsa-miR-186; hsa-miR-335	-
<i>CNN1</i>	hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-20b; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-424	-
<i>CXCL10</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-21; hsa-miR-186; hsa-miR-195	-
<i>CXCL2</i>	hsa-miR-19a; hsa-miR-27b	-
<i>CXCL3</i>	hsa-miR-10a; hsa-miR-548c-3p	-
<i>CYorf15A</i>	hsa-miR-186	-
<i>CYorf15B</i>	hsa-miR-19a	-
<i>DACT1</i>	hsa-miR-32; hsa-miR-548c-3p	-
<i>DDIT4</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-32; hsa-miR-101	-
<i>DDX43</i>	hsa-miR-548c-3p	-
<i>DEFA4</i>	hsa-miR-338-3p	-
<i>DEFB1</i>	hsa-miR-186	-
<i>DIRC1</i>	hsa-miR-20b; hsa-miR-32; hsa-miR-454; hsa-miR-301a;	-
<i>DSP</i>	hsa-miR-186; hsa-miR-548c-3p	-

<i>DUSP1</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-32; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b	-
<i>EGR2</i>	hsa-miR-20b; hsa-miR-32; hsa-miR-450a; hsa-miR-548c-3p	-
<i>EIF1AY</i>	hsa-miR-27b; hsa-miR-338-3p	-
<i>ERAP2</i>	hsa-miR-20b	-
<i>FAM118A</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-27b; hsa-miR-98	-
<i>FHL2</i>	hsa-miR-32	-
<i>FOLR3</i>	hsa-miR-7	-
<i>FOS</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-101; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-338-3p	-
<i>G0S2</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-195; hsa-miR-424	-
<i>GADD45B</i>	hsa-miR-454; hsa-miR-301a	-
<i>GSTT1</i>	hsa-miR-7	-
<i>HLA-DQB1</i>	hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-542-3p	-
<i>IER2</i>	hsa-miR-186	-
<i>IFNG</i>	hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-32	-
<i>IGJ</i>	hsa-miR-7	-
<i>IL6</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-26b; hsa-miR-98	-
<i>IL8</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-20b; hsa-miR-32; hsa-miR-98; hsa-miR-548c-3p	-
<i>ITGAD</i>	hsa-miR-18b; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-542-3p	-
<i>JUNB</i>	hsa-miR-101; hsa-miR-338-3p	-
<i>KANK1</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-195; hsa-miR-548c-3p	-
<i>LRRN3</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-26b; hsa-miR-101; hsa-miR-195; hsa-miR-424	-
<i>MAB21L2</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-19a	-
<i>MAFF</i>	hsa-miR-20b; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-454; hsa-miR-301a	-
<i>MT1M</i>	hsa-miR-26b; hsa-miR-548c-3p	-
<i>NGFRAP1</i>	hsa-miR-19a; hsa-miR-27b; hsa-miR-454; hsa-miR-301a	-
<i>NLRP3</i>	hsa-miR-20b	-
<i>NR4A2</i>	hsa-miR-20b; hsa-miR-186; hsa-miR-548c-3p	-
<i>NR4A3</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-10a; hsa-miR-20b; hsa-miR-32; hsa-miR-335	-
<i>OLFM4</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-98	-
<i>OSM</i>	hsa-miR-424	-

<i>PASK</i>	hsa-miR-18b	-
<i>PKD4</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-195; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-424	-
<i>PLAUR</i>	hsa-miR-335	-
<i>PNMAL1</i>	hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-335; hsa-miR-542-3p	-
<i>PRF1</i>	hsa-miR-450a	-
<i>PROK2</i>	hsa-miR-101	-
<i>PRUNE2</i>	hsa-miR-19a; hsa-miR-454	-
<i>PTGS2</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-33a; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-548c-3p	-
<i>PTX3</i>	hsa-miR-101; hsa-miR-186	-
<i>RCAN2</i>	hsa-miR-21; hsa-miR-27b; hsa-miR-186; hsa-miR-548c-3p	-
<i>RPS4Y1</i>	hsa-miR-19a	-
<i>SELENBP1</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-424	-
<i>SGK1</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-19a; hsa-miR-32; hsa-miR-195; hsa-miR-424	-
<i>SPOCD1</i>	hsa-miR-548c-3p	-
<i>SPON2</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-16; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-195; hsa-miR-424	-
<i>TMEM176A</i>	hsa-miR-338-3p	-
<i>TUBB2A</i>	hsa-miR-27b	-
<i>UTY</i>	hsa-miR-19a; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-548c-3p	-
<i>WNT2B</i>	hsa-let-7g; hsa-miR-16; hsa-miR-19a; hsa-miR-195; hsa-miR-454; hsa-miR-301a	-
<i>ZFY</i>	hsa-miR-186; hsa-miR-548c-3p	-
<i>TACSTD2</i>	-	hsa-miR-940
<i>HKDC1</i>	-	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-324-5p
<i>CACNG6</i>	-	hsa-miR-940
<i>CYB5R2</i>	-	hsa-miR-766
<i>PER1</i>	-	hsa-miR-423-5p
<i>IER3</i>	-	hsa-miR-342-3p
<i>NFKBIA</i>	-	hsa-miR-140-3p
<i>ADM</i>	hsa-miR-26b; hsa-miR-32; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-423-5p
<i>APOL6</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-27b; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-140-3p

<i>AQP9</i>	hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-454; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-324-5p
<i>ARL5B</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-26b; hsa-miR-33a; hsa-miR-101; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-940
<i>ATF3</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-195; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424	hsa-miR-342-3p
<i>C21orf7</i>	hsa-miR-10a; hsa-miR-186; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-940
<i>CD69</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-21; hsa-miR-32; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-424	hsa-miR-140-3p
<i>CD83</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-424	hsa-miR-342-3p
<i>CDC42EP2</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-32; hsa-miR-195; hsa-miR-424	hsa-miR-940
<i>CEACAM8</i>	hsa-miR-19a; hsa-miR-21; hsa-miR-186; hsa-miR-335; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>DOCK3</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-10a; hsa-miR-19a; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-423-5p
<i>DPYSL4</i>	hsa-miR-424	hsa-miR-342-5p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-940
<i>DUSP2</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-16; hsa-miR-20b; hsa-miR-98; hsa-miR-195; hsa-miR-338-3p	hsa-miR-423-5p
<i>EGR1</i>	hsa-miR-32; hsa-miR-335; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-423-5p
<i>EGR3</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-19a; hsa-miR-21; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>EMP1</i>	hsa-miR-33a; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>ENC1</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-33a; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-424	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-423-5p
<i>ERAP1</i>	hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-186; hsa-miR-335; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a	hsa-miR-140-3p
<i>EREG</i>	hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-26b; hsa-miR-32; hsa-miR-454; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-940
<i>FCRL5</i>	hsa-miR-16 hsa-miR-195 hsa-miR-542-3p hsa-miR-424	hsa-miR-766
<i>FOSB</i>	hsa-miR-27b; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>GBP1</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-18b; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-335; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-140-3p
<i>HBEGF</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-423-5p
<i>ICAM1</i>	hsa-miR-32; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a	hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>IL1B</i>	hsa-miR-21	hsa-miR-940
<i>KCNJ2</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-26b; hsa-miR-33a; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-424	hsa-miR-940

<i>KRT72</i>	hsa-miR-32; hsa-miR-542-3p	hsa-miR-423-5p
<i>LDLR</i>	hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a	hsa-miR-940
<i>LPL</i>	hsa-miR-27b; hsa-miR-32	hsa-miR-342-3p
<i>MAFB</i>	hsa-miR-33a; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a	hsa-miR-342-5p
<i>MAPK8IP1</i>	hsa-miR-10a; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-542-3p	hsa-miR-940
<i>MARCKS</i>	hsa-miR-27b; hsa-miR-186; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-140-3p
<i>MDGA1</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-27b; hsa-miR-32; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-195; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424	hsa-miR-324-5p; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-940
<i>NEBL</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-32; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>NFKBIZ</i>	hsa-miR-10a; hsa-miR-186; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>NUAK1</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-32; hsa-miR-126; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-424	hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>OLIG1</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-20b; hsa-miR-98; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-342-5p
<i>PDGFRB</i>	hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-338-3p	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766
<i>PF4V1</i>	hsa-miR-27b	hsa-miR-140-3p
<i>PFKFB3</i>	hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-26b; hsa-miR-186; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-424	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>PIM3</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-26b; hsa-miR-33a; hsa-miR-195; hsa-miR-424	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-940
<i>PLA2G4C</i>	hsa-miR-27b	hsa-miR-766
<i>PLEK</i>	hsa-miR-27b; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-335; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-423-5p
<i>PLK2</i>	hsa-miR-27b; hsa-miR-126; hsa-miR-338-3p	hsa-miR-342-3p
<i>PPIF</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-21; hsa-miR-27b; hsa-miR-195; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-424	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>PRSS23</i>	hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-186; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-342-5p
<i>PSPH</i>	hsa-miR-186	hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>PVRL2</i>	hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-195; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-424	hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>RBPMS2</i>	hsa-miR-27b; hsa-miR-32; hsa-miR-186; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-424	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-940
<i>RGS1</i>	hsa-miR-21; hsa-miR-27b; hsa-miR-101	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-423-5p

<i>S100B</i>	hsa-miR-186	hsa-miR-324-5p
<i>SMAD1</i>	hsa-miR-20b; hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-101; hsa-miR-186; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-342-3p
<i>SNAI1</i>	hsa-miR-27b; hsa-miR-32; hsa-miR-542-3p	hsa-miR-423-5p; hsa-miR-940
<i>SOCS3</i>	hsa-miR-19a; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b	hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>TMTC1</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-10a; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-26b; hsa-miR-32; hsa-miR-33a; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-335; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-766
<i>TNFAIP3</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-21; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-186; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-424	hsa-miR-423-5p
<i>TNFAIP6</i>	hsa-miR-32	hsa-miR-140-3p
<i>UCP3</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-454; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a	hsa-miR-324-5p
<i>VASH1</i>	hsa-miR-10a; hsa-miR-186; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-324-5p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>VIT</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-424	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-766
<i>VSTM2L</i>	hsa-miR-19a; hsa-miR-26b; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-542-3p	hsa-miR-324-5p; hsa-miR-342-5p
<i>ZFP36</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-27b; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-454; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-423-5p

ANEXO M - Expressão relativa dos microRNAs, avaliada por qRT-PCR, cujos alvos preditos estão associados aos processos de resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA em PBMCs de pacientes DM1 em relação ao grupo controle. Para todos os microRNAs, o ensaio foi realizado para 19 amostras de pacientes DM1 e para 11 amostras de indivíduos saudáveis não diabéticos, sendo tais amostras as mesmas utilizadas para o método de microarranjos de mRNAs. Os valores de expressão dos microRNAs de interesse foram normalizados com os valores de expressão do gene endógeno RNU48. Para o microRNA hsa-miR-101 (**A**) utilizou-se o teste T não pareado com correção de Welch, sendo que para os microRNAs hsa-miR-148a (**B**) e hsa-miR-424 (**D**), o teste T não pareado foi utilizado, sendo que as barras representam a média $\pm$ desvio padrão. Para o microRNA hsa-miR-27b (**C**) foi aplicado o teste Mann-Whitney e as barras representam a mediana e o intervalo interquartil. *** indica valores estatisticamente significativos para $p < 0,001$.

ANEXO N: Comparação dos valores de *fold change* (grupo de pacientes DM1 *versus* grupo controle), obtidos pelos métodos de microarranjos e qRT-PCR, para os microRNAs diferencialmente expressos selecionados. As mesmas amostras (19 pacientes DM1 e 11 controles) foram utilizadas para ambos os métodos.

ANEXO O - Lista da produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

TAKAHASHI P, Xavier DJ, Evangelista AF, Manoel-Caetano FS, Macedo C, Collares CV, Foss-Freitas MC, Foss MC, Rassi DM, Donadi EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET. MicroRNA expression profiling and functional annotation analysis of their targets in patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *Gene*, v. 539, p.213-223, 2014. DOI: 10.1016/j.gene.2014.01.075. (**ANEXO P**)

Xavier DJ, **TAKAHASHI P**, Manoel-Caetano FS, Foss-Freitas MC, Foss MC, Donadi EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET. One-week intervention period led to improvements in glycemic control and reduction in DNA damage levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2014 Sep;105(3):356-63. DOI: 10.1016/j.diabres.2014.06.004. Epub 2014 Jun 21. PMID: 25043705

Collares CV, Evangelista AF, Xavier DJ, **TAKAHASHI P**, Almeida R, Macedo C, Manoel-Caetano F, Foss MC, Foss-Freitas MC, Rassi DM, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA, Donadi EA. Transcriptome meta-analysis of peripheral lymphomononuclear cells indicates that gestational diabetes is closer to Type 1 Diabetes than to Type 2 Diabetes Mellitus. *Molecular Biology Reports*, v. 40, p. 5351-5358, 2013. DOI: 10.1007/s11033-013-2635-y.

Manoel-Caetano FS, Xavier DJ, Evangelista AF, **TAKAHASHI P**, Collares CV, Puthier D, Foss-Freitas MC, Foss MC, Donadi EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET. Gene expression profiles displayed by peripheral blood mononuclear cells from patients with Type 2 Diabetes Mellitus focusing on biological processes implicated on the pathogenesis of the disease. *Gene*, v. 511, p. 151-160, 2012. DOI: 10.1016/j.gene.2012.09.090.

Reisman D, **TAKAHASHI P**, Polson A, Boggs K. Transcriptional regulation of the p53 tumor suppressor gene in S-phase of the cell-cycle and the cellular response to DNA damage. *Biochemistry Research International*, v. 2012, p. 1-5, 2012. DOI: 10.1155/2012/808934.

TAKAHASHI P, Polson A, Reisman D. Elevated transcription of the p53 gene in early S-phase leads to a rapid DNA-damage response during S-phase of the cell cycle. *Apoptosis*, v. 16, p. 950-958, 2011. DOI: 10.1007/s10495-011-0623-z.

Polson A, **TAKAHASHI P**, Reisman D. ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) analysis demonstrates co-ordinated binding of two transcription factors to the promoter of the p53 tumour-suppressor gene. *Cell Biology International*, v. 34, p. 883-891, 2010. DOI: 10.1042/CBI20090401.

Artigo submetido à publicação

Xavier DJ, **TAKAHASHI P**, Evangelista AF, Foss-Freitas MC, Foss MC, Donadi EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET. Assessment of DNA damage and mRNA/miRNA transcriptional expression profiles in hyperglycemic versus non-hyperglycemic patients with type 2 Diabetes Mellitus, submetido em *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, volume especial “DNA damage and human diseases”.

Capítulo de livro

TAKAHASHI P, Xavier DJ, Sakamoto-Hojo ET. Expression of DNA repair and response to oxidative stress genes in diabetes mellitus. Chapter 9, “Transcriptomics in Health and Disease”, Springer, Ed. Passos GAS. ISBN: 978-3-319-11984-7. **(ANEXO Q)**

ANEXO P - Artigo publicado

Gene 539 (2014) 213–223

Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene

MicroRNA expression profiling and functional annotation analysis of their targets in patients with type 1 diabetes mellitus

Paula Takahashi^a, Danilo J. Xavier^a, Adriane F. Evangelista^{a,1}, Fernanda S. Manoel-Caetano^{a,b},
Claudia Macedo^{a,2}, Cristhianna V.A. Collares^{a,c}, Maria C. Foss-Freitas^d, Milton C. Foss^d, Diane M. Rassi^c,
Eduardo A. Donadi^{a,c}, Geraldo A. Passos^{a,e}, Elza T. Sakamoto-Hojo^{a,b,*}

^a Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Av. Bandeirantes 3900, Monte Alegre 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Av. Bandeirantes 3900, Monte Alegre 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Av. Bandeirantes 3900, Monte Alegre 14048-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Av. Bandeirantes 3900, Monte Alegre 14048-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^e Disciplines of Genetics and Molecular Biology, Department of Morphology, Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Av. Do Café s/n, Monte Alegre 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 September 2013

Received in revised form 18 December 2013

Accepted 29 January 2014

Available online 11 February 2014

Keywords:

Type 1 diabetes mellitus
microRNA
Microarray
Expression profile
T1DM candidate genes
Functional annotation analysis

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) results from an autoimmune attack against the insulin-producing pancreatic β -cells, leading to elimination of insulin production. The exact cause of this disorder is still unclear. Although the differential expression of microRNAs (miRNAs), small non-coding RNAs that control gene expression in a post-transcriptional manner, has been identified in many diseases, including T1DM, only scarce information exists concerning miRNA expression profile in T1DM. Thus, we employed the microarray technology to examine the miRNA expression profiles displayed by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from T1DM patients compared with healthy subjects. Total RNA extracted from PBMCs from 11 T1DM patients and nine healthy subjects was hybridized onto Agilent human miRNA microarray slides (V3), 8x15K, and expression data were analyzed on R statistical environment. After applying the rank products statistical test, the receiver-operating characteristic (ROC) curves were generated and the areas under the ROC curves (AUC) were calculated. To examine the functions of the differentially expressed (p -value < 0.01, percentage of false-positives < 0.05) miRNAs that passed the AUC cutoff value ≥ 0.90 , the database miRWalk was used to predict their potential targets, which were afterwards submitted to the functional annotation tool provided by the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID), version 6.7, using annotations from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis. We found 57 probes, corresponding to 44 different miRNAs (35 up-regulated and 9 down-regulated), that were differentially expressed in T1DM and passed the AUC threshold of 0.90. The hierarchical clustering analysis indicated the discriminatory power of those miRNAs, since they were able to clearly distinguish T1DM patients from healthy individuals. Target prediction indicated that 47 candidate genes for T1DM are potentially regulated by the differentially expressed miRNAs. After performing functional annotation analysis of the predicted targets, we observed 22 and 12 annotated KEGG pathways for the induced and repressed miRNAs, respectively. Interestingly, many pathways were enriched for the targets of both up- and down-regulated miRNAs and the majority of those pathways have been previously associated with T1DM, including many cancer-related pathways. In conclusion, our study indicated miRNAs that may be potential biomarkers of T1DM as well as provided new insights into the molecular mechanisms involved in this disorder.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: 8-OHdG, 8-hydroxydeoxyguanosine; AGO1, argonaute-1; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; AUC, area under the curve; CCL2, C-C motif chemokine 2; CCL3, C-C motif chemokine 3; CCL4, C-C motif chemokine 4; CDS, coding sequence; CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; CXCL10, C-X-C motif chemokine 10; DAVID, database for annotation, visualization, and integrated discovery; DMSO, dimethylsulfoxide; F-actin, filamentous actin; FAK, focal adhesion kinase; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; IAC, inter-array correlation; IL2RA, interleukin 2 receptor alpha; INS, insulin; KEGG, Kyoto encyclopedia of genes and genomes; LD, linkage disequilibrium; MAPK, mitogen-activated protein kinase; miRNAs, microRNAs; NOD, nonobese diabetic; NPH, neutral protamine Hagedorn; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PFP, percentage of false-positives; PTPN22, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22; RIN, RNA integrity number; ROBO1, roundabout, axon guidance receptor, homologue 1 (*Drosophila*); ROC, receiver-operating characteristic; SDF-1, stromal cell-derived factor-1; SLIT2, slit homologue 2; T1DM, type 1 diabetes mellitus; TGF- β , transforming growth factor-beta; UTR, untranslated region(s).

* Corresponding author at: Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Av. Bandeirantes 3900, Monte Alegre 14040-901, Ribeirão Preto, Brazil. Tel.: +55 16 3602 3827; fax: +55 16 3602 0222.

E-mail address: etsakamoto@usp.br (E.T. Sakamoto-Hojo).

¹ Present address: Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, R. Antenor Duarte Vilela 1331, Paulo Prata 14784-400, Barretos, SP, Brazil.

² Present address: Department of Dental Materials and Prosthodontics, Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Av. Do Café s/n, Monte Alegre 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.01.075>

0378-1119/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is one of the major subtypes of diabetes mellitus, which is a group of chronic metabolic diseases that arises from a deficiency in insulin secretion and/or action, leading to chronic high blood glucose levels (hyperglycemia) (ADA, 2013). Chronic hyperglycemia, in turn, has been implicated in long-term complications involving a variety of organs, including kidneys, eyes, heart, nerves, and blood vessels (ADA, 2013).

T1DM is a polygenic disorder triggered by environmental factors that results from a T cell-mediated autoimmune assault against the insulin-producing β -cells localized in the pancreatic islets of Langerhans. As a consequence of this autoimmune attack, a decrease and eventually halt of insulin synthesis occur (ADA, 2013; van Belle et al., 2011). Thus, the conventional treatment for T1DM patients is daily exogenous insulin administration (van Belle et al., 2011). Even though this disorder generally occurs early in life, it can arise at any age (ADA, 2013; van Belle et al., 2011). Moreover, it is estimated that this type of diabetes affects 5–10% of all diabetic patients (ADA, 2013), with approximately 78,000 children worldwide developing T1DM every year (<http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/the-global-burden>) (IDF, 2012).

Tiny RNA molecules, called microRNAs (miRNAs), are associated with several biological processes (such as development, differentiation, apoptosis, and proliferation) (Bartel, 2004), and interestingly, their differential expression has been detected in many disorders, such as different types of cancer (Dong et al., 2013; Jamieson et al., 2012; Lin et al., 2013; Martin et al., 2013; Zhang et al., 2013), stroke (Tan et al., 2013), type 2 diabetes (Balasubramanyam et al., 2011; Karolina et al., 2011), as well as cardiovascular (Bostjancic et al., 2010; Danowski et al., 2013), neurological (Minones-Moyano et al., 2011; Wong et al., 2013), and autoimmune diseases, including type 1 diabetes and associated nephropathy (Argyropoulos et al., 2013; Hezova et al., 2010; Liu et al., 2012; Nielsen et al., 2012; Pauley et al., 2008; Qin et al., 2013; Ridolfi et al., 2013; Salas-Perez et al., 2013; Sebastiani et al., 2011).

MiRNAs are endogenously expressed, evolutionarily conserved, small single-stranded non-coding RNAs of approximately 22 nucleotides in length that fine-tune gene expression (Bartel, 2004). In animals, miRNAs control gene expression in a post-transcriptional manner generally by partially base-pairing to specific sites located in the 3' untranslated regions (UTR) of their target mRNAs, triggering destabilization and degradation and/or translational inhibition of the latter (Bartel, 2009; Krol et al., 2010; Lee et al., 1993; Lim et al., 2005; Wightman et al., 1993). Estimates revealed that approximately 50% of all mammalian protein-coding genes are under their post-transcriptional control (Krol et al., 2010). Since their discovery in the nematode *Caenorhabditis elegans* in 1993 (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993), thousands of miRNAs have been identified, and to date, more than 2000 mature miRNAs have been described in humans (miRBase release 19, August 2012) (Griffiths-Jones, 2004; Griffiths-Jones et al., 2006, 2008; Kozomara and Griffiths-Jones, 2011).

As aforementioned, there is evidence that miRNAs are involved in many pathological conditions; in fact, it has been suggested that miRNAs may represent potential biomarkers for the early detection as well as therapeutic targets for the treatment of diabetes (Mao et al., 2013). Nevertheless, all the factors that contribute to the development and/or pathogenesis of T1DM have not been completely elucidated and only limited knowledge exists regarding the expression of these small regulatory molecules in T1DM relative to healthy subjects (Hezova et al., 2010; Nielsen et al., 2012; Salas-Perez et al., 2013). Hence, in the present study, we employed the microarray technology, a powerful tool that allows the investigation of hundreds of miRNAs simultaneously, to investigate the miRNA expression profile exhibited by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from T1DM patients compared with healthy subjects. By applying strict filtering criteria (p -value < 0.01, percentage of false-positives < 0.05, and area under the receiver-operating characteristic (ROC) curve (AUC) $\geq$ 0.90), we

identified a set of potential miRNA markers (with several being reported for the first time in the present work), which were able to clearly stratify the two groups (T1DM patients and non-diabetic subjects). In addition, target prediction of those miRNAs indicated several candidate genes for T1DM. Furthermore, many downstream pathways are possibly regulated by those miRNAs, shedding light into the molecular mechanisms implicated in T1DM.

2. Material and methods

2.1. Study subjects

A total of 11 patients presenting type 1 diabetes mellitus (3 women and 8 men, mean age = 23.5 ± 3.9 years, ranging from 18 to 30), recruited while undergoing regular follow-up at the Outpatient Endocrinology of the Clinical Hospital – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FMRP-USP), Brazil, and nine healthy subjects (control group) (5 women and 4 men, mean age = 25.1 ± 3.2 years, ranging from 20 to 29) participated in the present study. The main characteristics of all participants are described in Table 1. All patients were receiving treatment with human insulin and those presenting recent episodes of ketoacidosis and late diabetic complications, such as consolidated nephropathy, proliferative retinopathy, diabetic foot syndrome, autonomic neuropathy, and cardiovascular diseases, were excluded from the present study. Regarding the control group, individuals who were alcoholics, smokers, overweighted/obese, presented family history of diabetes, infections, hypertension, or long-term medication use were also excluded. The study protocol was approved by the local Ethics Committee of the Clinical Hospital – FMRP-USP, Brazil – (Permit# 9154/2008 and 13314/2011) and informed written consent was obtained from all participants.

2.2. Sample collection, isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and RNA extraction

Peripheral blood samples (20 mL) from all participants were collected by standard venipuncture in BD Vacutainer® tubes containing EDTA, followed by isolation of PBMCs by density gradient using Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO). Total RNA was extracted from the cells using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) in accordance with the manufacturer's protocol. After that, the purity and the concentration of RNA samples were measured by NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Products, Wilmington, DE) and their integrity was evaluated by microfluidic electrophoresis using RNA 6000 Nano kit and 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). RNA samples that were protein- and phenol-free and presented RNA integrity number (RIN) $\geq$ 7.0 were considered for the microarray analysis.

Table 1

Main characteristics of type 1 diabetes mellitus (T1DM) patients and healthy subjects (control group).

	T1DM	Control
Subjects (n)	11	9
Age (years)	23.5 ± 3.9 (18 to 30)	25.1 ± 3.2 (20 to 29)
Gender	3 F/8 M	5 F/4 M
Fasting blood glucose (mg/dL)	134.1 ± 95.8 (23 to 293)	87.4 ± 4.2 (81 to 94)
Glycated hemoglobin (%)	9.5 ± 0.7 (7.2 to 11.1)	–
Duration of diabetes (years)	9.1 ± 4.5 (2 to 16)	–
Insulin therapy	Lanthes/lispro (n = 1) NPH/regular (n = 7) Ultra-fast (n = 1) Lanthes/regular (n = 1) Levemir (n = 1)	–
Metformin (850 mg)	n = 1	–

F, female; M, male; duration of diabetes, period from T1DM diagnosis until the date of enrollment in the present study.

2.3. MicroRNA microarray

PBMCs microRNA profiling was generated using Human miRNA Microarray kit (V3), 8x15K (based on Sanger miRbase release 12.0, G4470C, Agilent Technologies, Santa Clara, CA), which contains 866 human and 89 human viral unique targeted probes.

The miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (5190-0456, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) was used for labeling and hybridization of 100 ng of total RNA, according to the manufacturer's instructions. Briefly, RNA samples were first dephosphorylated using calf intestinal phosphatase and denatured using dimethylsulfoxide (DMSO). Next, the RNA samples were labeled with cyanine 3-pCp using T4 RNA ligase for 2 h at 16 °C and hybridized onto the miRNA microarrays for 20 h at 55 °C in a hybridization oven at 20 rpm. After the washing steps with Gene Expression Wash Buffers 1 and 2 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), the slides were scanned using an Agilent Microarray Scanner (Agilent Technologies). Expression data were extracted from the scanned images using Feature Extraction software, version 10.7 (Agilent Technologies), and microarray data from all samples used in this study as well as the experimental conditions are available at the MIAME public database ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/miameexpress>), under the accession E-MEXP-3409, which was previously deposited by our group (Collares et al., 2013), and E-MEXP-3960 (T1DM patients) and E-MEXP-3961 (control group).

2.4. Data analysis

2.4.1. Expression data normalization, statistical analysis, and receiver-operating characteristic (ROC) curves generation

Expression data were analyzed on R statistical environment (<http://www.r-project.org>) (R Development Core Team, 2006) (version 2.15.1). The background was adjusted by subtracting the median background values from the median expression values obtained via the Feature Extraction software, followed by log base 2 transformation. Next, quantile normalization was applied to the data using the *aroma-light* R package (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/aroma.light.html>) (Bengtsson, Preprint, 2004:18). Following, to detect outlier samples, inter-array correlation (IAC) (Oldham et al., 2008) was performed using the *Cluster* R package ([cran.r-project.org/package = cluster](http://cran.r-project.org/package=cluster)) (Maechler et al., 2013).

Subsequently, the rank products statistical analysis was applied to the data, using the *RankProd* R package (Hong et al., 2006). The expression levels of miRNAs were considered statistically significant in T1DM patients compared with the control group for $p < 0.01$ and percentage of false-positives (FPF) < 0.05 . To obtain a single expression value for each probeset, the median expression value was calculated for the multiple probesets corresponding to a unique miRNA.

To investigate the discriminatory power of the differentially expressed miRNAs to distinguish between the T1DM patients and the non-diabetic subjects, receiver-operating characteristic (ROC) curves were generated and the areas under the curves (AUCs) were calculated using the *ROCR* (<http://rocr.bioinf.mpi-sb.mpg.de/>) (Sing et al., 2005) and *gplots* (<http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>) (Warnes et al., 2013) R packages. In this study, we used the AUC cutoff value ≥ 0.90 . By using these strict parameters, we aimed to point potential miRNA markers for the disease (Enhanced Heat Map (heatmap.2), 2013; Hierarchical Clustering (hclust), 2013). Next, to visualize the expression pattern of miRNAs displayed by PBMCs from T1DM patients versus the control group, the hierarchical clustering analysis was performed using the *hclust* function (<http://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/hclust.html>) and the R package *gplots* (<http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>) (Warnes et al., 2013), with the heatmap being generated using the *gplots* function *heatmap.2* (<http://hoshio.ees.hokudai.ac.jp/~kubo/Rdoc/library/gplots/html/heatmap.2.html>). The Pearson uncentered correlation was used as the distance metric with average linkage.

2.4.2. MiRNA target prediction and T1DM candidate gene search

To examine the functions of the differentially expressed miRNAs that presented AUC values ≥ 0.90 , miRNA target prediction was performed using the *miRWalk* database (Dweep et al., 2011), which integrates nine established target prediction tools: *miRWalk* (March 2011 release), *Diana-microT* (version 3.0), *miRanda* (August 2010 release), *miRDB* (April 2009 release), *PICTAR* (March 2007 release), *PITA* (August 2008 release), *RNA22* (May 2008 release), *RNAhybrid* (version 2.1), and *Targetscan* (version 5.1). In the present study, only miRNA–target interactions identified by at least five prediction programs on 3' untranslated regions (UTR) of all known human genes were considered for further analysis. Target prediction was performed separately for up- and down-regulated miRNAs.

To investigate whether the differentially expressed miRNAs (featuring AUC values ≥ 0.90) were possibly regulating candidate genes for T1DM, the *VENNY* tool (Oliveros, 2007), which compares lists (in this case of genes) via Venn diagrams, was used to compare the predicted targets of those miRNAs with a list of 76 candidate genes for T1DM. The latter list was obtained from T1DBase (last update on October 15th, 2013) (<http://www.t1dbase.org/page/Regions/display/species/human/disease/1/type/assoc>) (Burren et al., 2011). This database maintains an up-to-date table of human T1DM susceptibility regions (and the putative candidate genes) identified from genome-wide association studies. The loci included in this table exhibited genome wide significant evidence of association to T1DM ($p < 5 \times 10^{-8}$) or more moderate evidence ($p < 10^{-4}$) in a region which is a confirmed susceptibility locus for another autoimmune disease. Furthermore, studies have been added to the regions where the variant of interest is not in linkage disequilibrium (LD) with the T1DM variant of interest yet one of the candidate genes of interest matches the T1DM causal gene. The protein-coding genes pointed by these studies as well as those indicated as causal gene candidates for each region were all considered as candidate genes for T1DM.

Following, the candidate genes obtained from the aforementioned analysis were compared with those identified by Helwak et al. (2013) using the *VENNY* tool (Oliveros, 2007). In their work, Helwak et al. (2013) developed a technique for crosslinking, ligation, and sequencing of hybrids (CLASH) to allow direct, high-throughput mapping of miRNA–target RNA duplexes associated with human argonaute-1 (AGO1) protein as chimeric reads in deep-sequencing data. Thus, this comparison was performed to identify candidate genes regulated by miRNAs shared by both ours and Helwak's study, to investigate whether the same miRNAs interacted with the same candidate genes in both studies, and to compare the difference between the miRNA-binding sites (3'UTR, coding sequence (CDS), and 5'UTR of the candidate genes for T1DM) predicted by us (3'UTR – *miRWalk* database) and those identified by the CLASH technique.

2.4.3. Functional annotation analysis of the predicted targets

The two lists of predicted targets (up-regulated and down-regulated miRNAs) were separately submitted to the functional annotation tool provided by the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID), version 6.7 (Huang et al., 2009a, 2009b). The putative targets were annotated by the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), with redundant pathways being manually removed. A pathway was considered to be significantly enriched only if it passed the count threshold of three genes per annotation term and presented EASE score, with Benjamini–Hochberg correction set to < 0.05 . In the DAVID database, the EASE score is a modified Fisher exact p-value used for enrichment analysis within gene lists, with p-value = 0 representing perfect enrichment (http://david.abcc.ncifcrf.gov/helps/functional_annotation.html#summary).

Next, because KEGG enrichment analysis indicated several cancer-related pathways, the *VENNY* tool (Oliveros, 2007) was used to compare the list of 44 differentially expressed miRNAs (present data) with the list of 52 differentially modulated miRNAs in two human cancer

cell lines (chronic myeloid leukemia blast crisis cell line, K562, and acute promyelocytic leukemia cell line, HL60) when compared with normal peripheral blood mononuclear cells by deep sequencing of small RNAs (Vaz et al., 2010).

3. Results

3.1. Distinct miRNA expression exhibited by PBMCs from T1DM patients relative to non-diabetic subjects

We compared the miRNA expression profiles presented by PBMCs from 11 T1DM patients with those of nine non-diabetic subjects by carrying out miRNA microarray experiments. A total of 146 unique probes showed significant differences (p -value < 0.01 and PFP < 0.05) in expression levels between the T1DM patients and the control group. Out of those, 57 probes, corresponding to 44 different miRNAs (35 up-regulated and 9 down-regulated), passed the AUC threshold of 0.90, ranging from 0.90 to 1.00. The values of fold change, p , PFP, and AUC for each of those 44 microRNAs are presented in Table 2. Next, the results were visualized by performing the hierarchical clustering analysis (Pearson uncentered distance metric with average linkage) using the normalized expression values of those miRNAs. It is possible to observe that those miRNAs possess a discriminatory power to stratify T1DM patients from healthy individuals, as all patients were clustered together and separated from the control subjects (Fig. 1).

3.2. Candidate genes for T1DM potentially regulated by the differentially expressed miRNAs

We searched for the predicted targets of the 44 differentially expressed miRNAs featuring AUC values ≥ 0.90 by integrating at least five prediction programs. Results indicated 10,827 and 6636 putative target-genes for the up-regulated and down-regulated miRNAs, respectively. Following, we compared the predicted targets of the 44 differentially expressed miRNAs that presented AUC values ≥ 0.90 to previously reported T1DM candidate genes. Interestingly, out of the 76 putative candidate genes for T1DM, a total of 47 are possibly regulated by the miRNAs with altered expression identified in our work, with one and 21 genes being controlled by the down- and up-regulated miRNAs, respectively, and 25 by both (Table 3).

Out of those 47 candidate genes for T1DM that we identified as predicted targets of the differentially expressed miRNAs (present data), 21 were reported to be interacting with miRNAs *in vitro* by the CLASH technique (Helwak et al., 2013). It is important to note that according to Helwak et al. (2013), the miRNA-binding sites were located not only in 3'UTRs of the candidate genes, but also in CDSs and 5'UTRs. Furthermore, only three miRNA-mRNA target interactions pointed by CLASH matched the ones predicted by us: hsa-miR16-TBP, hsa-miR16-CYP27B1, and hsa-miR423-5p-MTMR3 (Table 4).

3.3. Potential functions of the differentially expressed miRNAs

After target prediction, we performed the functional annotation analysis on the two lists of predicted targets using KEGG pathways. After removing redundant terms, our findings pointed 22 annotated KEGG pathways for the overexpressed miRNAs and 12 KEGG pathways for the repressed miRNAs (Fig. 2A and B, respectively). The differentially expressed miRNAs associated with each KEGG pathway are indicated in Table 5. Interestingly, KEGG-pathway enrichment analysis indicated several enriched pathways shared by both up- and down-regulated miRNAs: chemokine and insulin signaling pathways, axon guidance, melanogenesis, endocytosis, and cancer (focal adhesion, p53 and Wnt signaling pathways and apoptosis). Concerning the pathways that are potentially controlled only by the up-regulated miRNAs, we found many associated with cancer (TGF- β , MAPK, and Hedgehog signaling pathways and regulation of actin cytoskeleton), GnRH, calcium,

Table 2

Differentially expressed miRNAs featuring AUC values equal to or greater than 0.90.

Agilent probe ID	miRNA	Fold change	p-Value	PFP	AUC
A_25_P00013755	ebv-miR-BART12	1.63	0.0E+00	5.0E-04	0.92
A_25_P00010089	hsa-let-7f	1.82	0.0E+00	1.0E-04	0.98
A_25_P00012141	hsa-let-7g	1.56	1.0E-04	2.9E-03	0.91
A_25_P00012038	hsa-miR-101	1.91	0.0E+00	5.0E-05	0.94
A_25_P00010470	hsa-miR-10a	1.54	1.0E-04	4.3E-03	0.93
A_25_P00012215	hsa-miR-126	2.04	0.0E+00	0.0E+00	0.97
A_25_P00012216	hsa-miR-126	1.76	0.0E+00	1.0E-04	0.95
A_25_P00010600	hsa-miR-126*	3.36	0.0E+00	0.0E+00	0.94
A_25_P00014590	hsa-miR-126*	2.70	0.0E+00	0.0E+00	0.92
A_25_P00015210	hsa-miR-1275	0.61	0.0E+00	1.6E-03	0.97
A_25_P00012177	hsa-miR-140-3p	0.63	0.0E+00	3.4E-03	0.98
A_25_P00010131	hsa-miR-148a	1.60	1.0E-04	3.5E-03	0.91
A_25_P00010134	hsa-miR-148b	2.01	0.0E+00	0.0E+00	0.96
A_25_P00013371	hsa-miR-15b*	1.61	0.0E+00	1.3E-03	1.00
A_25_P00010599	hsa-miR-16	1.50	2.0E-04	7.4E-03	0.97
A_25_P00012242	hsa-miR-186	1.65	0.0E+00	4.0E-04	0.92
A_25_P00012431	hsa-miR-18b	1.54	1.0E-04	4.5E-03	0.98
A_25_P00010769	hsa-miR-195	2.16	0.0E+00	0.0E+00	0.96
A_25_P00012063	hsa-miR-199a-3p	1.80	0.0E+00	2.0E-04	0.90
A_25_P00010998	hsa-miR-19a	1.58	1.5E-04	4.6E-03	0.96
A_25_P00013170	hsa-miR-20a*	1.51	1.0E-04	4.6E-03	0.98
A_25_P00013171	hsa-miR-20a*	1.62	1.0E-04	3.1E-03	0.97
A_25_P00010615	hsa-miR-20b	1.67	0.0E+00	1.0E-04	0.96
A_25_P00010975	hsa-miR-21	3.46	0.0E+00	0.0E+00	0.99
A_25_P00010976	hsa-miR-21	3.52	0.0E+00	0.0E+00	0.97
A_25_P00012001	hsa-miR-26b	2.21	0.0E+00	0.0E+00	0.96
A_25_P00012002	hsa-miR-26b	2.04	0.0E+00	0.0E+00	0.97
A_25_P00010761	hsa-miR-27b	1.82	0.0E+00	1.0E-04	0.93
A_25_P00014837	hsa-miR-27b	1.75	0.0E+00	2.5E-04	0.94
A_25_P00013973	hsa-miR-301a	1.93	0.0E+00	1.0E-04	0.97
A_25_P00014610	hsa-miR-30e*	1.79	0.0E+00	1.0E-04	1.00
A_25_P00014611	hsa-miR-30e*	1.64	5.0E-05	2.0E-03	0.96
A_25_P00012021	hsa-miR-32	2.03	0.0E+00	0.0E+00	0.94
A_25_P00012022	hsa-miR-32	2.11	0.0E+00	0.0E+00	0.94
A_25_P00012023	hsa-miR-32	2.20	0.0E+00	0.0E+00	0.92
A_25_P00010153	hsa-miR-324-5p	0.56	0.0E+00	0.0E+00	0.92
A_25_P00010214	hsa-miR-335	1.81	0.0E+00	0.0E+00	0.92
A_25_P00012395	hsa-miR-338-3p	2.05	0.0E+00	0.0E+00	0.96
A_25_P00012026	hsa-miR-33a	1.50	3.0E-04	9.1E-03	0.98
A_25_P00013545	hsa-miR-340*	1.61	1.0E-04	2.9E-03	0.98
A_25_P00012358	hsa-miR-342-3p	0.57	0.0E+00	7.0E-04	0.98
A_25_P00012354	hsa-miR-342-5p	0.68	1.0E-04	7.2E-03	0.94
A_25_P00012419	hsa-miR-423-5p	0.55	0.0E+00	7.0E-04	0.97
A_25_P00011109	hsa-miR-424	2.37	0.0E+00	0.0E+00	0.97
A_25_P00011110	hsa-miR-424	2.30	0.0E+00	0.0E+00	0.99
A_25_P00012436	hsa-miR-450a	1.49	5.0E-05	1.8E-03	0.98
A_25_P00012437	hsa-miR-450a	1.57	0.0E+00	4.0E-04	0.96
A_25_P00012870	hsa-miR-454	1.64	0.0E+00	6.0E-04	0.99
A_25_P00012871	hsa-miR-454	1.87	0.0E+00	1.0E-04	0.93
A_25_P00014904	hsa-miR-542-3p	1.49	1.5E-04	5.5E-03	1.00
A_25_P00010743	hsa-miR-548c-3p	1.64	0.0E+00	2.0E-04	0.93
A_25_P00012077	hsa-miR-7	1.54	1.0E-04	4.6E-03	0.96
A_25_P00015265	hsa-miR-720	0.56	0.0E+00	1.6E-03	0.91
A_25_P00011964	hsa-miR-766	0.66	1.0E-04	5.7E-03	0.93
A_25_P00011965	hsa-miR-766	0.64	5.0E-05	3.6E-03	0.94
A_25_P00013090	hsa-miR-940	0.62	0.0E+00	3.2E-03	0.96
A_25_P00010048	hsa-miR-98	1.95	0.0E+00	0.0E+00	0.98

neurotrophin, and T cell receptor signaling pathways, gap junction, long-term potentiation, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and epithelial cell signaling in *Helicobacter pylori* infection. On the other hand, Notch signaling pathway and adherens junction were the only two pathways that may be exclusively regulated by the repressed miRNAs.

Moreover, 12 out of the 44 differentially expressed miRNAs with AUC values ≥ 0.90 overlapped differentially modulated miRNAs in two cancer cell lines as compared with normal PBMCs (Vaz et al., 2010) (Table 6). Similar to our work, two miRNAs were found up-regulated (hsa-miR-98 and hsa-miR-199a-3p) and two down-regulated (hsa-miR-342-3p and hsa-miR-324-5p) in Vaz's study. Of interest, out of those 12 miRNAs, nine up-regulated (according to our results) are among those that are potentially regulating three cancer-related pathways: Wnt, TGF- β , and Hedgehog signaling pathways; while all 10 up-

Fig. 1. Distinct miRNA expression pattern in T1DM patients. Heatmap of the 57 significantly expressed probes (p -value < 0.01 , PFP < 0.05) that passed the AUC threshold of 0.90, corresponding to 44 different miRNAs, in T1DM patients compared with healthy individuals. MiRNAs were clustered using the Pearson uncentered distance metric with average linkage. Each column represents an individual sample and each row represents an individual miRNA. Expression levels of miRNAs are shown in red (up-regulated) and green (down-regulated), with brighter shades indicating higher fold differences. Absence of difference in expression levels is represented in black.

regulated (according to our results) miRNAs are among those that are potentially regulating six cancer-related pathways: pathways in cancer, focal adhesion, regulation of actin cytoskeleton, p53 and MAPK signaling pathways, and apoptosis (Table 5). Furthermore, out of those 12 miRNAs, the two down-regulated are among those that are possibly controlling six pathways implicated in cancer: pathways in cancer, focal adhesion, adherens junction, p53 and Wnt signaling pathways, and apoptosis (Table 5).

4. Discussion

In this study, we used the microarray technology, which is a powerful tool that allows the investigation of hundreds of miRNAs concurrently, to search for miRNAs with abnormal expression in PBMCs from T1DM patients compared with non-diabetic subjects. By applying stringent parameters, we detected a set of differentially expressed miRNAs that better stratify the two groups as well as uncovered pathways that are possibly regulated by those small regulatory RNAs.

Since the exact cause of T1DM remains unclear, the detection of novel biomarkers and their potential implications in the etiology of this

disease may contribute to a better understanding of the mechanisms involved in this condition. In addition, it is advantageous to the clinical practice, enabling a more adequate management and even an earlier diagnosis, ultimately enhancing quality of life. MiRNAs are known to be implicated in a series of biological processes (Bartel, 2004) and their abnormal expression has been described in many autoimmune diseases, including T1DM (Argyropoulos et al., 2013; Hezova et al., 2010; Liu et al., 2012; Nielsen et al., 2012; Pauley et al., 2008; Qin et al., 2013; Ridolfi et al., 2013; Salas-Perez et al., 2013; Sebastiani et al., 2011). Moreover, an estimated 80% of all human genes are expressed in peripheral blood cells and gene expression in these cells can be affected by environmental changes (Liew et al., 2006), with the possibility that miRNAs could also present those features. Hence, peripheral blood cell miRNA-based biomarkers may allow the comprehensive investigation of T1DM.

Only a few other studies assessed miRNA expression displayed by T1DM patients relative to healthy non-diabetic subjects. Hezova et al. (2010) performed miRNA profiling of T regulatory cells from long-term T1DM adults and among the significantly expressed miRNAs, hsa-miR-342 (whose current miRbase ID is hsa-miR-342-3p) was found repressed. Similarly, the latter was found down-regulated in the

Table 3 Candidate genes for T1DM and the corresponding differentially expressed miRNAs featuring AUC values ≥ 0.90 that potentially regulate them.

Candidate genes	Up-regulated miRNAs	Down-regulated miRNAs
<i>PTPN22</i>	hsa-miR-32; hsa-miR-335; hsa-miR-548c-3p	–
<i>IL10</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-98	–
<i>AFF3</i>	hsa-miR-548c-3p	–
<i>STAT4</i>	hsa-miR-186	–
<i>HLA-DQB1</i>	hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-542-3p	–
<i>TAGAP</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-20b; hsa-miR-21; hsa-miR-32	–
<i>DLL1</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-195; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-424	–
<i>FAM120B</i>	hsa-miR-548c-3p	–
<i>ERBB3</i>	hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-335; hsa-miR-454; hsa-miR-301a	–
<i>DLK1</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-33a; hsa-miR-195; hsa-miR-424	–
<i>CIITA</i>	hsa-miR-148a; hsa-miR-148b	–
<i>PTPN2</i>	hsa-miR-10a; hsa-miR-335; hsa-miR-454	–
<i>CD226</i>	hsa-miR-101; hsa-miR-548c-3p	–
<i>TYK2</i>	hsa-miR-27b	–
<i>CENPO</i>	hsa-miR-20b; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-301a	hsa-miR-423-5p
<i>IKZF1</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-33a; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-342-5p
<i>COBL</i>	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-766
<i>GLIS3</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-26b; hsa-miR-98; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-424	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-940
<i>PRKCQ</i>	hsa-miR-26b; hsa-miR-32; hsa-miR-186	hsa-miR-423-5p
<i>CD69</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-21; hsa-miR-32; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-301a; hsa-miR-424	hsa-miR-140-3p
<i>METTL1</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-338-3p	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-766
<i>SOC1</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-19a; hsa-miR-98; hsa-miR-335	hsa-miR-324-5p; hsa-miR-766
<i>FUT2</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p	hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>HORMAD2</i>	hsa-miR-18b; hsa-miR-27b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-940
<i>CIQTNF6</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-195	hsa-miR-940
<i>C10orf59</i>	hsa-miR-32; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-423-5p
<i>CD55</i>	hsa-miR-548c-3p	–
<i>DNMT3A</i>	hsa-miR-101	–
<i>IL2</i>	hsa-miR-186	–
<i>KIAA1109</i>	hsa-miR-27b; hsa-miR-32	–
<i>HLA-A</i>	hsa-miR-26b; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b	–
<i>MAP3K7</i>	hsa-miR-10a; hsa-miR-548c-3p	–
<i>PHF10</i>	hsa-miR-101; hsa-miR-548c-3p	–
<i>NUPR1</i>	–	hsa-miR-342-5p; hsa-miR-1275
<i>ADCY3</i>	hsa-miR-27b; hsa-miR-32; hsa-miR-335	hsa-miR-342-3p
<i>CTLA4</i>	hsa-miR-18b; hsa-miR-542-3p	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-324-5p
<i>BACH2</i>	hsa-miR-7; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-19a; hsa-miR-32; hsa-miR-33a; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424	hsa-miR-342-5p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-940
<i>C6orf120</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-186	hsa-miR-766
<i>TBP</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-195; hsa-miR-424	hsa-miR-324-5p; hsa-miR-342-3p
<i>SKAP2</i>	hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-335; hsa-miR-542-3p	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-423-5p
<i>CYP27B1</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-21; hsa-miR-195; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-424	hsa-miR-342-3p
<i>SH2B3</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-10a; hsa-miR-19a; hsa-miR-32; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-342-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940
<i>RASGRP1</i>	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-20b; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-33a; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-454; hsa-miR-301a	hsa-miR-940
<i>CLEC16A</i>	hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-32; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-424	hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766
<i>ORMDL3</i>	hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-126; hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-766
<i>MTMR3</i>	hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-20a; hsa-miR-20b; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-423-5p
<i>LIF</i>	hsa-miR-10a; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-335; hsa-miR-424	hsa-miR-940

current work. Furthermore, still in agreement with our results, the expression levels of sera miRNAs from children and adolescents with recent-onset T1DM were examined and results revealed hsa-miR-148a and hsa-miR-27b among the induced miRNAs (Nielsen et al., 2012). In contrast to our findings, significantly low expression levels of hsa-miR-21 was reported in PBMCs from long-term T1DM children (Salas-Perez et al., 2013), while in the present study we observed an

up-regulation of this miRNA in PBMCs from T1DM patients. All the other differentially modulated miRNAs detected in our work have not been reported in any other publication that also compared patients with type 1 diabetes with healthy individuals. Hence, in addition to confirming the findings of miRNAs with significantly abnormal expression in patients suffering from T1DM, we identified new dysregulated miRNAs in T1DM patients relative to the control subjects. Interestingly,

Table 4

Comparison of the interactions between miRNAs and the candidate genes for T1DM predicted by the current work with those identified by Helwak et al. (2013).

Candidate genes	miRNA-binding sites indicated by Helwak's study	miRNA-mRNA interactions shared by the present and Helwak's studies
<i>CD55</i>	3'UTR	–
<i>DNMT3A</i>	3'UTR	–
<i>IL2</i>	CDS	–
<i>KIAA1109</i>	CDS	–
<i>HLA-A</i>	CDS	–
<i>MAP3K7</i>	3'UTR; CDS	–
<i>PHF10</i>	CDS	–
<i>NUPR1</i>	3'UTR	–
<i>ADCY3</i>	CDS	–
<i>CTLA4</i>	3'UTR	–
<i>BACH2</i>	CDS	–
<i>C6orf120</i>	3'UTR	–
<i>TBP</i>	3'UTR; CDS	TBP-hsa-miR-16 (3' UTR)
<i>SKAP2</i>	CDS	–
<i>CYP27B1</i>	3'UTR; CDS	CYP27B1-hsa-miR-16 (CDS)
<i>SH2B3</i>	3'UTR	–
<i>RASGRP1</i>	CDS	–
<i>CLEC16A</i>	3'UTR; CDS	–
<i>ORMDL3</i>	3'UTR	–
<i>MTMR3</i>	3'UTR; CDS; 5'UTR	MTMR3-hsa-miR-423-5p (CDS)
<i>LIF</i>	CDS	–

The 21 candidate genes shared between both works. Regarding the miRNA-mRNA interactions shared by both studies, the miRNA-binding sites identified by Helwak et al. (2013) are indicated in parenthesis.

we observed two differentially expressed miRNAs (hsa-miR-148a and hsa-miR-27b) in long-term T1DM patients that have also been identified in recent-onset patients (Nielsen et al., 2012), suggesting that the

differentially expressed miRNAs detected in the present work may represent potential markers with a regulatory role in the development of T1DM.

Following the detection of promising miRNA biomarkers of the disorder, their potential targets were predicted. At the individual target level, we focused on the candidate genes for T1DM. In addition to the *HLA* genes, which confer the highest genetic risk for the disease and are located on chromosome 6p21, non-*HLA* genes have also been associated with T1DM, such as the genes encoding insulin (*INS*) on 11p15, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (*CTLA4*) on 2q33, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (*PTPN22*) on 1p13, and interleukin 2 receptor alpha (*IL2RA*) on 10p15 (Barrett et al., 2009; Bell et al., 1984; Bottini et al., 2004; Burren et al., 2011; Lowe et al., 2007; Nistico et al., 1996). Up to date, more than 70 candidate genes for the disease have been described (T1DBase, last updated on October 15th, 2013) (Burren et al., 2011). Intriguingly, out of those, 47 are possible targets of the differentially expressed miRNAs identified in the present study, giving further support to the important role of these small RNA molecules in the pathogenesis of T1DM. In addition, the expression of a group of candidate genes for T1DM in human pancreatic islets was modulated upon a 48-hour exposure to cytokines, which are pro-inflammatory mediators with a role in the pathogenesis of T1DM (Eizirik et al., 2012). Interestingly, among the genes whose expression was altered by cytokines were *CYP27B1*, *NUPR1*, *SOC1*, *LIF*, *HLA-DQB1*, *CIITA*, *CD55*, *RASGRP1*, *C1QTNF6*, *SKAP2*, *FAM120B*, *ADCY3*, *COBL*, and *ERBB3*, candidate genes pointed as potential targets of the differentially expressed miRNAs in the current study.

Furthermore, among those 47 candidate genes for T1DM that we identified as predicted targets of the differentially expressed miRNAs,

Fig. 2. KEGG pathway functional annotation of the differentially expressed up-regulated (A) and down-regulated (B) miRNA (AUC values ≥ 0.90) predicted targets. Enrichment scores corresponding to each pathway provided by the DAVID annotation tool are displayed as $-\log p$ -values.

Table 5
Significantly enriched KEGG pathways and the miRNAs that potentially regulate them.

KEGG pathways	Up-regulated miRNAs
Amyotrophic lateral sclerosis	hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-101; hsa-miR-195; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-19a; hsa-miR-21; hsa-miR-98; hsa-miR-186; hsa-miR-335; hsa-miR-454; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-15b*; hsa-miR-16; hsa-miR-20b; hsa-miR-32; hsa-miR-126 hsa-miR-338-3p; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-450a; hsa-miR-33a; hsa-miR-18b; hsa-miR-20a*.
Apoptosis	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-101; hsa-miR-10a; hsa-miR-19a; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-335; hsa-miR-454; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-32; hsa-miR-126; hsa-miR-450a; hsa-miR-33a.
Axon guidance	hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-18b; hsa-miR-33a; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-7; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-19a; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-195; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-32; hsa-miR-335; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-20b; hsa-miR-98; hsa-miR-450a; hsa-miR-424; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-20a*.
Calcium signaling pathway	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-33a; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424; hsa-miR-32; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-450a; hsa-miR-20a*.
Chemokine signaling pathway	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-33a; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424; hsa-miR-32; hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-15b*; hsa-miR-21; hsa-miR-450a; hsa-miR-126.
Endocytosis	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-186; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-19a; hsa-miR-32; hsa-miR-101; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-195; hsa-miR-424; hsa-miR-10a; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-20b; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-18b; hsa-miR-33a; hsa-miR-450a; hsa-miR-20a*.
Epithelial cell signaling in <i>Helicobacter pylori</i> infection	hsa-miR-32; hsa-miR-186; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-26b; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-16; hsa-miR-195; hsa-miR-424; hsa-miR-10a; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-33a; hsa-miR-98; hsa-miR-7; hsa-miR-18b; hsa-miR-27b; hsa-miR-101; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-335; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-21; hsa-miR-98; hsa-miR-450a.
Focal adhesion	hsa-miR-19a; hsa-miR-10a; hsa-miR-186; hsa-miR-26b; hsa-miR-548c-3p; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-335; hsa-miR-101; hsa-miR-33a; hsa-miR-21; hsa-miR-32; hsa-miR-126; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-20a*; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-450a.
Gap junction	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-33a; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424; hsa-miR-32; hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-450a; hsa-miR-21; hsa-miR-20a*.
GnRH signaling pathway	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-33a; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424; hsa-miR-32; hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-450a; hsa-miR-21; hsa-miR-20a*.
Hedgehog signaling pathway	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-98; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-32; hsa-miR-10a; hsa-miR-19a; hsa-miR-27b; hsa-miR-101; hsa-miR-186; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-21; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-195; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-20b; hsa-miR-33a; hsa-miR-26b; hsa-miR-18b; hsa-miR-20a*; hsa-miR-450a.
Insulin signaling pathway	hsa-miR-195; hsa-miR-16; hsa-miR-424; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-101; hsa-miR-19a; hsa-miR-26b; hsa-miR-335; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-32; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-10a; hsa-miR-33a; hsa-miR-126; hsa-miR-21; hsa-miR-126*; hsa-miR-450a.
Long-term potentiation	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-33a; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424; hsa-miR-26b; hsa-miR-32; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-7; hsa-miR-450a; hsa-miR-21.
MAPK signaling pathway	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-186; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-101; hsa-miR-10a; hsa-miR-19a; hsa-miR-32; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-335; hsa-miR-33a; hsa-miR-450a; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-126; hsa-miR-20a*.
Melanogenesis	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-20b; hsa-miR-27b; hsa-miR-33a; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-424; hsa-miR-32; hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-450a; hsa-miR-21.
Neurotrophin signaling pathway	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-101; hsa-miR-10a; hsa-miR-21; hsa-miR-32; hsa-miR-126; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-19a; hsa-miR-26b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-450a; hsa-miR-33a; hsa-miR-20a*.
p53 signaling pathway	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-10a; hsa-miR-19a; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-101; hsa-miR-186; hsa-miR-335; hsa-miR-454; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-16; hsa-miR-195; hsa-miR-424; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-32; hsa-miR-7; hsa-miR-15b*; hsa-miR-20a*; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-33a; hsa-miR-126.
Pathways in cancer	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-186; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-101; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-32; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-19a; hsa-miR-27b; hsa-miR-9a; hsa-miR-126; hsa-miR-33a; hsa-miR-450a; hsa-miR-20a*.
Regulation of actin cytoskeleton	hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-20b; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-27b; hsa-miR-32; hsa-miR-101; hsa-miR-195; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-19a; hsa-miR-10a; hsa-miR-186; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-98; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-18b; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-454; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-301a; hsa-miR-126; hsa-miR-33a; hsa-miR-450a; hsa-miR-15b*; hsa-miR-20a*.
T cell receptor signaling pathway	hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-98; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-195; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-20b; hsa-miR-101; hsa-miR-33a; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-10a; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-19a; hsa-miR-32; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-335; hsa-miR-450a; hsa-miR-21; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-126.
TGF-beta signaling pathway	hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-7; hsa-miR-98; hsa-miR-21; hsa-miR-26b; hsa-miR-186; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-10a; hsa-miR-16; hsa-miR-27b; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-542-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-20b; hsa-miR-101; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-32; hsa-miR-19a; hsa-miR-33a; hsa-miR-18b.
Wnt signaling pathway	hsa-miR-27b; hsa-let-7f; hsa-let-7g; hsa-miR-16; hsa-miR-98; hsa-miR-195; hsa-miR-335; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-424; hsa-miR-15b*; hsa-miR-18b; hsa-miR-19a; hsa-miR-101; hsa-miR-454; hsa-miR-301a; hsa-miR-7; hsa-miR-26b; hsa-miR-10a; hsa-miR-32; hsa-miR-33a; hsa-miR-148a; hsa-miR-148b; hsa-miR-186; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-450a; hsa-miR-20b; hsa-miR-548c-3p; hsa-miR-20a*; hsa-miR-21; hsa-miR-542-3p.

Table 5 (continued)

KEGG pathways	Down-regulated miRNAs
Adherens junction	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940; hsa-miR-140-3p; hsa-miR-1275.
Apoptosis	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940; hsa-miR-1275; hsa-miR-140-3p; hsa-miR-324-5p.
Axon guidance	hsa-miR-324-5p; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-940; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-140-3p.
Chemokine signaling pathway	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940; hsa-miR-140-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-1275; hsa-miR-324-5p.
Endocytosis	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-940; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-140-3p; hsa-miR-1275.
Focal adhesion	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940; hsa-miR-1275; hsa-miR-140-3p.
Insulin signaling pathway	hsa-miR-423-5p; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-940; hsa-miR-1275; hsa-miR-140-3p.
Melanogenesis	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940; hsa-miR-140-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-1275.
Notch signaling	hsa-miR-140-3p; hsa-miR-940; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-1275; hsa-miR-342-5p.
p53 signaling pathway	hsa-miR-766; hsa-miR-940; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-140-3p; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-342-5p.
Pathways in cancer	hsa-miR-342-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-940; hsa-miR-1275; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-140-3p.
Wnt signaling pathway	hsa-miR-324-5p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-766; hsa-miR-940; hsa-miR-140-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-342-3p; hsa-miR-1275.

21 were identified in miRNA-target RNA duplexes associated with the human AGO1 (Helwak et al., 2013). Importantly, according to Helwak et al. (2013) the miRNA-binding sites for those 21 candidate genes were located in 3'UTRs, CDSs, and 5'UTRs, which is in accordance with other works that have shown miRNA-binding sites in 5'UTRs (Grey et al., 2010; Helwak et al., 2013) and more commonly in the mRNA CDSs (Hafner et al., 2010; Helwak et al., 2013; Reczko et al., 2012). However, only three miRNA-candidate gene interactions were shared between our predictions and the results obtained from Helwak's work. Nevertheless, it does not indicate that the other interactions predicted by the present study do not occur *in vivo*. The reason for that is because Helwak et al. (2013) investigated the miRNA-target interactions bound to human AGO1, but it is still not well-established whether all miRNAs interact with exact the same mRNA-targets when associated with different AGOs (Helwak et al., 2013). Moreover, these other predicted interactions deserve to be further validated in the context of T1DM versus control subjects because it is likely that the spectrum of miRNA-mRNA interactions quickly alters under different conditions (differentiation, viral infection, metabolic alterations, and environmental insults) (Helwak et al., 2013).

Moreover, this work provided new insights into the complex molecular mechanisms involved in T1DM by revealing pathways that are possibly regulated by those miRNAs. Several KEGG pathways were potentially regulated by both up- and down-regulated miRNAs. Interestingly, the majority of those pathways have been previously associated with T1DM: pathways in cancer, chemokine and insulin signaling pathways, axon guidance, and endocytosis.

Although it has not been well-established, there is evidence of a relationship between T1DM and elevated risk of several types of cancer. According to a cohort study performed in Sweden, relative to the general population, patients affected by T1DM presented an excess of 20% in the overall cancer incidence (Zendeheidel et al., 2003). Regarding organ- or tissue-specific cancers, elevated risks of cervix, endometrium, stomach, squamous cell skin carcinoma, leukemia, mouth and pharynx,

liver, and esophagus cancers have been observed for T1DM (Shu et al., 2010; Wideroff et al., 1997; Zendeheidel et al., 2003). In agreement with this information, three independent studies reported significantly increased concentrations of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), a specific marker of oxidative DNA damage, in the urine of T1DM patients compared with control subjects, indicating that these patients present increased risk of mutagenesis (Goodarzi et al., 2010; Hata et al., 2006; Tsukahara et al., 2003). Furthermore, Vaz et al. (2010) identified a total of 52 distinct differentially expressed miRNAs in two human cancer cell lines when compared with normal peripheral blood mononuclear cells by deep sequencing of small RNAs. Intriguingly, 12 out of the 52 miRNAs detected in Vaz's work overlapped those identified by us. More importantly, those 12 miRNAs are among the ones that are potentially regulating the cancer-related pathways pointed in our study. The latter observations suggest that the 12 overlapping miRNAs may serve as potential cancer biomarkers. Altogether, our findings corroborate studies from the literature that link T1DM and cancer, with the possibility that increased DNA damage observed in T1DM patients may contribute to the elevated cancer incidence seen in these patients.

Concerning the insulin signaling pathway, the amount of insulin needed to achieve optimal glycemic control in T1DM patients is much higher than its normal physiological concentration, thus triggering iatrogenic hyperinsulinemia, evidenced by the two-fold increase in the levels of this hormone in the periphery (plasma) of T1DM patients when compared with those observed in age- and weight-matched healthy subjects (Wang et al., 2013). Thus, marked iatrogenic hyperinsulinemia could explain why insulin signaling pathway was among the ones significantly enriched for the predicted targets of modulated miRNAs (both down- and up-regulated), even though the production/secretion of this hormone ceases in patients with T1DM.

The predicted targets of both the down- and up-regulated miRNAs were also significantly enriched in the group of genes associated with two other pathways, chemokine signaling pathway and axon guidance, which had both been hitherto implicated in T1DM. The chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) is involved in chemorepulsion by lowering the adhesion of diabetogenic T cells from nonobese diabetic (NOD/Lt) mice, which may be essential in controlling autoimmune cell recruitment into the pancreas (Sharp et al., 2008). More importantly, binding of roundabout, axon guidance receptor, homologue 1 (*Drosophila*) (ROBO1) to its ligand, slit homologue 2 (SLIT2), is implicated in this event. Interestingly, elevated T cell ROBO1 expression has been detected both in NOD mice and in patients with T1DM, which could represent a complementary response involved in regulating aggressive T cell recruitment into the pancreas (Glawe et al., 2013). Besides the involvement of a chemokine (SDF-1) in the T cell biology as aforementioned, abnormal levels of these pro-inflammatory molecules were also reported in T1DM. A study showed that compared with relatives presenting moderate risk, relatives of T1DM patients presenting an increased risk of developing the disease exhibited aberrant serum levels of three out of the six chemokines investigated: CCL3 and CCL4 (elevated) and CCL2 (decreased) (Hanifi-Moghaddam et al., 2006). Similarly, serum levels

Table 6

Differentially expressed miRNAs featuring AUC values ≥ 0.90 (present data) that overlapped differentially modulated miRNAs in cancer cell lines as compared with normal PBMCs (Vaz et al., 2010) and their regulation.

miRNAs	Regulation in the present study	Regulation in Vaz's study
hsa-let-7g	Up	Down
hsa-miR-101	Up	Down
hsa-miR-126	Up	Down
hsa-miR-16	Up	Down
hsa-miR-186	Up	Down
hsa-miR-199a-3p	Up	Up
hsa-miR-21	Up	Down
hsa-miR-27b	Up	Down
hsa-miR-7	Up	Down
hsa-miR-98	Up	Up
hsa-miR-324-5p	Down	Down
hsa-miR-342-3p	Down	Down

of CXCL10 were found significantly elevated in children with T1DM at onset compared with first-degree relatives and control subjects, although the levels lowered at follow-up (Antonelli et al., 2008). Hence, our findings suggest that aberrant expression of miRNAs may be involved in the abnormal expression of chemokines observed in T1DM patients and may also impair self-tolerance by interfering with T cell biology via molecules that are also implicated in chemokine signaling pathway and axon guidance.

Furthermore, according to our results, focal adhesion and endocytosis were significantly enriched for the putative targets of the aberrantly expressed miRNAs. Notably, these pathways have been implicated in T1DM as suggested by other authors. It has been reported that the migration and adhesion ability of mesenchymal stem cells (that bear the potential to differentiate into islet and pancreatic cells) derived from bone marrow of NOD mice was decreased, which could be due to the irregular distribution of focal adhesion kinase (FAK) and filamentous actin (F-actin) exhibited by those cells (Li et al., 2011). Regarding the endocytic pathway, the pro-inflammatory cytokines activate signaling cascades that trigger cell death of pancreatic β cells. Interestingly, it has been demonstrated that treatment of insulin-producing RINm5F cells with toxic cytokines led to differential modulation of genes whose protein products are involved in endocytosis (Souza et al., 2004). Notably, genes that positively control this pathway were found up-regulated and those that negatively regulate this pathway were repressed, thus instigating internalization of cytokine receptors. Collectively, these events can play a role in protecting β cells from cytokine-mediated toxicity (Souza et al., 2004). Thus, our study suggests that dysregulation in miRNA expression could be one of the events that lead to the disruption of cell behavior observed in T1DM and could also interfere with the protective role of endocytosis.

In conclusion, the current study identified a set of 44 differentially expressed miRNAs that bear the potential to be molecular markers of T1DM, as they clearly discriminated patients with T1DM from healthy subjects. Furthermore, many candidate genes for T1DM are predicted targets of those miRNAs. Notably, our results corroborate the literature in the sense that many biological pathways that have been previously implicated in this disorder are possibly regulated by those 44 miRNAs, including several cancer-related pathways. In fact, many miRNAs (present data) overlapped differentially modulated miRNAs in cancer cell lines relative to normal PBMCs. Our findings also suggest that miRNA profiling may be a potential strategy to be applied in the clinical settings for the diagnosis and better management of T1DM. Altogether, the present work provided novel information that might contribute to a better understanding of the molecular mechanisms as well as biological pathways implicated in T1DM.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* – FAPESP, Brazil (FAPESP numbers 2010/12069-7, 2008/56594-8, 2010/00932-2, and 2010/05622-1), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, Brazil), and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, Brazil).

References

- ADA (American Diabetes Association), 2013. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 36 (Suppl. 1), S67–S74.
- Antonelli, A., et al., 2008. Serum Th1 (CXCL10) and Th2 (CCL2) chemokine levels in children with newly diagnosed Type 1 diabetes: a longitudinal study. *Diabet. Med.* 25, 1349–1353.
- Argyropoulos, C., et al., 2013. Urinary microRNA profiling in the nephropathy of type 1 diabetes. *PLoS One* 8, e54662.
- Balasubramanyam, M., et al., 2011. Impaired miR-146a expression links subclinical inflammation and insulin resistance in Type 2 diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* 351, 197–205.
- Barrett, J.C., et al., 2009. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat. Genet.* 41, 703–707.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Bell, G.I., Horita, S., Karam, J.H., 1984. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 33, 176–183.
- Bengtsson, H., 2004. Aroma – an R object-oriented microarray analysis environment. Centre for Mathematical Sciences, Lund University (Preprint 2004:18, <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/aroma.light.html>). Access March 10, 2013).
- Bostjancic, E., Zidar, N., Stajer, D., Glavac, D., 2010. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. *Cardiology* 115, 163–169.
- Bottini, N., et al., 2004. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes. *Nat. Genet.* 36, 337–338.
- Burren, O.S., Adlem, E.C., Achuthan, P., Christensen, M., Coulson, R.M., Todd, J.A., 2011. T1DBase: update 2011, organization and presentation of large-scale data sets for type 1 diabetes research. *Nucleic Acids Res.* 39, D997–D1001.
- Collares, C.V., et al., 2013. Identifying common and specific microRNAs expressed in peripheral blood mononuclear cell of type 1, type 2, and gestational diabetes mellitus patients. *BMC Res. Notes* 6, 491.
- Danowski, N., Manthey, L., Jakob, H.G., Siffert, W., Peters, J., Frey, U.H., 2013. Decreased expression of miR-133a but not of miR-1 is associated with signs of heart failure in patients undergoing coronary bypass surgery. *Cardiology* 125, 125–130.
- Dong, Y., et al., 2013. Tumor suppressor functions of miR-133a in colorectal cancer. *Mol. Cancer Res.* 11, 1051–1060.
- Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P., Gretz, N., 2011. miRWalk-database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* 44, 839–847.
- Eizirik, D.L., et al., 2012. The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines. *PLoS Genet.* 8, e1002552.
- Enhanced Heat Map (heatmap.2), 2013. <http://hoshoe.ees.hokudai.ac.jp/~kubo/Rdoc/library/gplots/html/heatmap.2.html> (Access April 10, 2013).
- Glawe, J.D., et al., 2013. SDF-1-CXCR4 differentially regulates autoimmune diabetogenic T cell adhesion through ROBO1-SLIT2 interactions in mice. *Diabetologia* 56, 2222–2230.
- Goodarzi, M.T., Navidi, A.A., Rezaei, M., Babahmadi-Rezaei, H., 2010. Oxidative damage to DNA and lipids: correlation with protein glycation in patients with type 1 diabetes. *J. Clin. Lab. Anal.* 24, 72–76.
- Grey, F., et al., 2010. A viral microRNA down-regulates multiple cell cycle genes through mRNA 5'UTRs. *PLoS Pathog.* 6, e1000967.
- Griffiths-Jones, S., 2004. The microRNA registry. *Nucleic Acids Res.* 32, D109–D111.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A.J., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 34, D140–D144.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S., Enright, A.J., 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 36, D154–D158.
- Hafner, M., et al., 2010. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* 141, 129–141.
- Hanifi-Moghaddam, P., et al., 2006. Altered chemokine levels in individuals at risk of Type 1 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 23, 156–163.
- Hata, I., Kaji, M., Hirano, S., Shigematsu, Y., Tsukahara, H., Mayumi, M., 2006. Urinary oxidative stress markers in young patients with type 1 diabetes. *Pediatr. Int.* 48, 58–61.
- Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., Tollervey, D., 2013. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* 153, 654–665.
- Hezova, R., et al., 2010. microRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. *Cell. Immunol.* 260, 70–74.
- Hierarchical Clustering (hclust), 2013. <http://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/hclust.html> (Access April 10, 2013).
- Hong, F., Breitling, R., McEntee, C.W., Wittner, B.S., Nemhauser, J.L., Chory, J., 2006. RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics* 22, 2825–2827.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 37, 1–13.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57.
- IDF (International Diabetes Federation), 2012. The global burden, IDF diabetes Atlas 5th edition. <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/the-global-burden> (Access June 25, 2013).
- Jamieson, N.B., et al., 2012. MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 18, 534–545.
- Karolina, D.S., et al., 2011. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 6, e22839.
- Kozomara, A., Griffiths-Jones, S., 2011. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 39, D152–D157.
- Krol, J., Loedige, I., Filipowicz, W., 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* 11, 597–610.

- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Li, L., et al., 2011. Suppression of the PI3K-Akt pathway is involved in the decreased adhesion and migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from non-obese diabetic mice. *Cell Biol. Int.* 35, 961–966.
- Liew, C.C., Ma, J., Tang, H.C., Zheng, R., Dempsey, A.A., 2006. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J. Lab. Clin. Med.* 147, 126–132.
- Lim, L.P., et al., 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769–773.
- Lin, L., Lin, Y., Jin, Y., Zheng, C., 2013. Microarray analysis of microRNA expression in liver cancer tissues and normal control. *Gene* 523, 158–160.
- Liu, R., et al., 2012. Differential microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from Graves' disease patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E968–E972.
- Lowe, C.E., et al., 2007. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the *IL2RA* region in type 1 diabetes. *Nat. Genet.* 39, 1074–1082.
- Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M., Hornik, K., 2013. Cluster: cluster analysis basics and extensions. R package version 1.14.4. <http://cran.r-project.org/package=cluster> (Access March 10, 2013).
- Mao, Y., Mohan, R., Zhang, S., Tang, X., 2013. MicroRNAs as pharmacological targets in diabetes. *Pharmacol. Res.* 75, 37–47.
- Martin, J., et al., 2013. Differentially expressed miRNAs in retinoblastoma. *Gene* 512, 294–299.
- Minones-Moyano, E., et al., 2011. MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3067–3078.
- Nielsen, L.B., et al., 2012. Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression. *Exp. Diabetes Res.* 2012, 896362.
- Nistico, L., et al., 1996. The *CTLA-4* gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum. Mol. Genet.* 5, 1075–1080.
- Oldham, M.C., et al., 2008. Functional organization of the transcriptome in human brain. *Nat. Neurosci.* 11, 1271–1282.
- Oliveros, J.C., 2007. Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (Access November 20, 2013).
- Pauley, K.M., Satoh, M., Chan, A.L., Bubb, M.R., Reeves, W.H., Chan, E.K., 2008. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Ther.* 10, R101.
- Qin, B., Huang, F., Liang, Y., Yang, Z., Zhong, R., 2013. Analysis of altered microRNA expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with primary biliary cirrhosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 28, 543–550.
- R Development Core Team, 2006. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing (<http://www.r-project.org>. Access April 10, 2013).
- Reczek, M., Maragkakis, M., Alexiou, P., Grosse, I., Hatzigeorgiou, A.G., 2012. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics* 28, 771–776.
- Ridolfi, E., et al., 2013. Expression and genetic analysis of MicroRNAs involved in multiple sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 4375–4384.
- Salas-Perez, F., Codner, E., Valencia, E., Pizarro, C., Carrasco, E., Perez-Bravo, F., 2013. MicroRNAs miR-21a and miR-93 are down regulated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with type 1 diabetes. *Immunobiology* 218, 733–737.
- Sebastiani, G., Grieco, F.A., Spagnuolo, I., Galleri, L., Cataldo, D., Dotta, F., 2011. Increased expression of microRNA miR-326 in type 1 diabetic patients with ongoing islet autoimmunity. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 27, 862–866.
- Sharp, C.D., et al., 2008. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 stimulates chemorepulsion of NOD/LtJ T-cell adhesion to islet microvascular endothelium. *Diabetes* 57, 102–112.
- Shu, X., Ji, J., Li, X., Sundquist, K., Hemminki, K., 2010. Cancer risk among patients hospitalized for Type 1 diabetes mellitus: a population-based cohort study in Sweden. *Diabet. Med.* 27, 791–797.
- Sing, T., Sander, O., Beerenwinkel, N., Lengauer, T., 2005. ROCr: visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics* 21, 3940–3941 (<http://rocr.bioinf.mpi-sb.mpg.de/>).
- Souza, K.L., Elsner, M., Mathias, P.C., Lenzen, S., Tiedge, M., 2004. Cytokines activate genes of the endocytotic pathway in insulin-producing RINm5F cells. *Diabetologia* 47, 1292–1302.
- Tan, J.R., et al., 2013. Blood microRNAs in Low or No Risk Ischemic Stroke Patients. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 2072–2084.
- Tsukahara, H., et al., 2003. Formation of advanced glycosylation end products and oxidative stress in young patients with type 1 diabetes. *Pediatr. Res.* 54, 419–424.
- van Belle, T.L., Coppieters, K.T., von Herrath, M.G., 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol. Rev.* 91, 79–118.
- Vaz, C., et al., 2010. Analysis of microRNA transcriptome by deep sequencing of small RNA libraries of peripheral blood. *BMC Genomics* 11, 288.
- Wang, M.Y., et al., 2013. Iatrogenic hyperinsulinemia in type 1 diabetes: its effect on atherogenic risk markers. *J. Diabetes Complications* 27, 70–74.
- Warnes, G.R., et al., 2013. Various R programming tools for plotting data, version 2.11.0.1. (<http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>. Access April 10, 2013).
- Wideroff, L., et al., 1997. Cancer incidence in a population-based cohort of patients hospitalized with diabetes mellitus in Denmark. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 1360–1365.
- Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862.
- Wong, H.K., et al., 2013. De-repression of FOXO3a death axis by microRNA-132 and -212 causes neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 22, 3077–3092.
- Zendehdel, K., Nyren, O., Ostenson, C.G., Adami, H.O., Ekblom, A., Ye, W., 2003. Cancer incidence in patients with type 1 diabetes mellitus: a population-based cohort study in Sweden. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 1797–1800.
- Zhang, J., et al., 2013. Differential expression profiling and functional analysis of microRNAs through stages I–III papillary thyroid carcinoma. *Int. J. Med. Sci.* 10, 585–592.

ANEXO Q - Capítulo de livro

Chapter 9. Expression of DNA Repair and Response to Oxidative Stress Genes in Diabetes Mellitus

Paula Takahashi^a, Danilo J. Xavier^a, and Elza T. Sakamoto-Hojo^{a,b}

^a Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School

^b Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto
University of São Paulo – USP
paulatakahashi@hotmail.com
danjordan55@yahoo.com.br
etshojo@usp.br

Abstract

Diabetes Mellitus (DM) is a group of chronic metabolic diseases that arises from a deficiency in insulin secretion and/or action, resulting in hyperglycemia. The two main categories of DM are type 1 diabetes mellitus (T1DM) and type 2 diabetes mellitus (T2DM). An interplay between oxidative stress and both T1DM and T2DM has been observed, with evidence indicating that oxidative stress can be the cause and also a consequence of both types of DM. In fact, a number of studies has detected elevated levels of oxidative stress markers and DNA damage (a consequence of oxidative stress), as well as an impaired antioxidant system in patients suffering from T1DM or T2DM. Accordingly, several works have identified differentially expressed genes that are associated with responses to oxidative stress and DNA damage in T1DM as well as in T2DM patients. In addition, a set of microRNAs that has been previously shown to clearly distinguish T1DM patients from healthy subjects targets a plethora of genes involved in DNA repair and response to oxidative stress. Collectively, these studies indicate that patients with DM present changes in the gene expression profiles as a response to the insults to which they are subjected as part of the development and/or as a consequence of the disease.

9.1 Introduction

9.1.1 Reactive Oxygen Species: Definition and Consequences

Reactive oxygen species (ROS) are reactive small molecules that contain an oxygen atom in their structure (Lenzen 2008, Halliwell and Gutteridge 2007). These small molecules can be free radicals with an unpaired electron, such as superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) and hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$); non-radicals, such as hydrogen peroxide (H_2O_2); anions, including superoxide ($O_2^{\cdot-}$) and peroxynitrite ($ONOO^-$); non-ions, including H_2O_2 and $OH^{\cdot}$. The reactivity of all these different reactive species varies, with $OH^{\cdot}$ being the most reactive oxygen radical (Lenzen 2008). Besides exogenous sources, including smoke, air pollutants, ultraviolet radiation, γ -irradiation, and many drugs, ROS can also be derived from several endogenous sources, such as NADPH oxidases (NOXs), the mitochondrial respiratory chain, xanthine oxidase, lipoxygenases, cyclooxygenases, cytochrome P450 enzymes, nitric oxide synthases, among others (Nathan and Cunningham-Bussel 2013, Jiang et al. 2011).

In normal conditions, ROS play a role in physiological processes that trigger adequate cellular responses (Rains and Jain 2011). ROS provide protection to the host by killing invading pathogens, as well as act as cellular messengers in a network of intra and intercellular communication pathways (Kalyanaraman 2013, Edeas et al. 2010). In contrast, an excessive amount of ROS can be detrimental to the cells. To counteract ROS, cells are equipped with a number of enzymatic and non-enzymatic mechanisms as well as with an adaptive mechanism that results in the expression of antioxidant genes. Concerning the enzymatic machinery, superoxide dismutases (SODs) are involved in the normal dismutation of superoxide and there are at least three types of SODs: cytosolic copper/zinc SOD, mitochondrial manganese SOD, and extracellular SOD (Kalyanaraman 2013). H_2O_2 is detoxified by catalase (CAT) when its levels are low and by glutathione peroxidase enzyme (GPx) when its levels are higher. GPx also metabolizes other lipid peroxides (LOOH) (Kalyanaraman 2013). Regarding the non-enzymatic detoxification mechanisms, the small molecular weight antioxidants include ascorbic

acid (vitamin C), α -tocopherol (vitamin E), reduced glutathione (GSH), and β -carotene. While vitamin C reacts rapidly with several ROS, such as superoxide and hydroxyl radical, vitamin E can halt lipid peroxidation (Kalyanaraman 2013). The constant exposure to a mild amount of oxidants triggers the elevated production of antioxidant enzymes and this intrinsic mechanism ultimately leads to the re-establishment of the cellular oxidant/antioxidant homeostasis. This adaptive mechanism consists of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) binding to DNA sequences present in antioxidant response elements (ARE) and inducing the transcription of antioxidant genes, including, but not limited to SOD, GPx, and CAT (Kalyanaraman 2013).

However, a state known as oxidative stress, in which the levels of prooxidants overcome those of antioxidants, can occur. Oxidative stress can be a consequence of reduced concentrations of antioxidants or antioxidant enzymes or impaired adaptive mechanism, and it can also be a consequence of elevated generation of ROS (Kalyanaraman 2013). Oxidative stress can cause oxidative damage to DNA (the focus of this chapter); it is important to note that proteins, lipids, and carbohydrates are also subjected to oxidative damage (Storr et al. 2013, Kalyanaraman 2013).

ROS can react with both purines and pyrimidines of DNA, generating a number of DNA base products, and because guanine exhibits a low redox potential, it is preferentially oxidized, with 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoguanine; 8-oxoG) being the most extensively studied DNA lesion (Dizdaroglu 2012, Storr et al. 2013). ROS can also cause DNA intrastrand and interstrand crosslinks, DNA-protein crosslinks, DNA single and double strand breaks (SSB and DSB, respectively), as well as damage to the sugar moiety of DNA (Dizdaroglu 2012, Storr et al. 2013). DNA damage can be mutagenic, hence, perturbing maintenance of genomic stability. Thus, repair pathways have evolved to remove oxidative DNA lesions and restore DNA structure, protecting cells from such a harmful condition (Dizdaroglu 2012, Storr et al. 2013). Base-excision repair (BER) and nucleotide-excision repair (NER) are the two key pathways in repairing oxidative DNA damage (Dizdaroglu 2012, Friedberg et al. 2006). However, there exist other mechanisms: mismatch repair (MMR), a repair pathway in the cellular nucleotide pool, homologous recombination (HR), and non-homologous end-joining (NHEJ) (Dizdaroglu 2012).

The ROS pathway, from the exogenous and endogenous sources to the repair pathways involved in removing the DNA lesions caused by ROS, is better depicted in Fig. 16.1.

9.1.2 Diabetes Mellitus and ROS

Diabetes Mellitus (DM) is a group of chronic metabolic diseases that arises from a deficiency in insulin secretion and/or action, which, in turn, leads to chronic high blood glucose levels (hyperglycemia). The latter has been implicated in long-term complications involving a variety of organs, including kidneys, eyes, heart, nerves, and blood vessels (ADA 2013). Individuals are diagnosed with diabetes when displaying one of the following: glycated hemoglobin levels (HbA1C) $\geq 6.5\%$, fasting plasma glucose levels (FPG) ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L), 2-hour plasma glucose levels after 75 g glucose load ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) (in the absence of unequivocal hyperglycemia, these three parameters should be confirmed by retaking the test), or for individuals with classic hyperglycemic symptoms/hyperglycemic crisis, casual plasma glucose levels ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) (ADA 2013). According to the International Diabetes Federation, there were approximately 382 million people between the ages of 20 and 79 years with diabetes worldwide in 2013 (<http://www.idf.org/diabetesatlas>) (IDF 2013). Hence, DM represents a relevant public health issue.

The two major forms of DM are type 1 diabetes mellitus (T1DM) and type 2 diabetes mellitus (T2DM). There is evidence of an association between oxidative stress and both types of DM: oxidative stress can be a consequence of these disorders due to hyperglycemia, but it can also be a contributing factor to the pathogenesis of both diseases because reactive molecules play a crucial role in pancreatic β -cell damage. Hyperglycemia may lead to increased oxidative stress by the direct production of ROS or by changes in the redox homeostasis through the disruption of a variety of mechanisms: elevated polyol pathway flux, higher intracellular production of advanced glycation end-products (AGEs), activation of protein kinase C, or even increased generation of superoxide by the mitochondrial electron transport chain (Rains and Jain 2011, Brownlee 2001, Ahmad et al. 2005). On the other hand, in the case of T1DM, the invading immune cells release pro-inflammatory cytokines into the target β -cells and those cytokines, in turn, increase the production of reactive species, which

leads to β -cell destruction (Lenzen 2008). Regarding T2DM, β -cell failure is the major contributing factor to its pathogenesis. In this type of diabetes, glucotoxicity (which includes ROS generation) and lipotoxicity are involved in the β -cell dysfunction as these cells are subjected to longstanding exposure to elevated levels of glucose and free fatty acids (Drews et al. 2010). In addition, according to some studies, low levels of GPx or CAT protein and activity have been observed in human islets (Drews et al. 2010, Tonooka et al. 2007, Robertson and Harmon 2007), rendering these cells more vulnerable to reactive species.

Taken together, these studies have indicated a crosstalk between the two major forms of DM and oxidative stress (that is better depicted in Fig. 16.2), which, in turn, can trigger DNA damage. Thus, it is reasonable that in order to cope with the disease and its consequences, patients suffering from DM are responding to all these insults in several ways, including via alterations in the gene expression profiles.

9.2 T1DM

T1DM is a consequence of the autoimmune elimination of the insulin-producing pancreatic β -cells, which eventually ceases insulin production and hence the absorption of glucose by the tissues of the body (ADA 2013, Wållberg and Cooke 2013). Approximately 5-10% of all diabetic patients present T1DM, which can occur even in the elderly, although it usually arises during childhood and adolescence (ADA 2013). For the development of T1DM, an immune response with strong proinflammatory features against the pancreatic β -cell antigens must arise and the control of the autoimmune responses must be impaired so those responses can become chronic, leading to the elimination of β -cells (Wållberg and Cooke 2013).

The exact cause of this form of diabetes has not been elucidated, but it has been suggested that several susceptibility genes combined with environmental insults contribute to the development of this disease (ADA 2013, Wållberg and Cooke 2013). Regarding the genetic background, the HLA genes located on chromosome 6p21 confer the highest genetic risk for T1DM; other genes including those encoding insulin (*INS*) on 11p15, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (*CTLA4*) on 2q33, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (*PTPN22*) on 1p13, and interleukin 2 receptor alpha (*IL2RA*) on 10p15, also present strong associations with the disorder (Burren et al. 2011, Barrett et al. 2009, Bell et al. 1984, Nisticò et al. 1996, Bottini et al. 2004, Lowe et al. 2007). With respect to environmental factors, both the presence and the absence of infections, as well as climate and diet have been suggested to contribute to T1DM onset (Wållberg and Cooke 2013, von Herrath 2009, Zaccane and Cooke 2011, Cooper et al. 2011, Zepitis and Akobeng 2008).

9.2.1 Oxidative Stress and DNA Damage in T1DM

Several studies have investigated the levels of antioxidants, markers of oxidative stress, and DNA damage in patients suffering from T1DM relative to healthy subjects. Codoñer-Franch and colleagues (2010) found significantly elevated levels of the three oxidative stress markers (circulating levels of lipoperoxides (LPO) and malondialdehyde (MDA) and plasma concentration of carbonyl groups (CG)), a slightly decreased erythrocyte GPx activity, and a significant decrease in α -tocopherol/total cholesterol ratio in T1DM children with good glycemic control *versus* age-matched control subjects. On the contrary, the same authors did not observe differences in the erythrocyte concentration of GPx's cofactor GSH or in the serum levels of β -carotene. Moreover, another work has demonstrated reduced SOD and GPx activities in leukocytes from men and women with T1DM in comparison with their corresponding controls (Dinçer et al. 2003). In the same work, the authors reported that strand breakage and formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg)-sensitive sites (oxidised DNA damage detected by the comet assay with the DNA repair enzyme Fpg) were elevated in leukocytes of the two groups of patients. Furthermore, according to Goodarzi et al. (2010), plasma MDA and glycated serum protein (GSP) levels were significantly increased in T1DM patients relative to healthy subjects. In agreement with Hata et al. (2006), the previously mentioned study also observed that urinary concentrations of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) were significantly higher in T1DM patients when compared with the control group. Likewise, significantly elevated levels of both nuclear DNA fragmentation and concentrations of 8-OHdG have also been reported in spermatozoa from T1DM patients relative to non-diabetic fertile men (Agbaje et al. 2008). Regarding basal levels of

DNA damage, significantly elevated rates were found in neutrophils from T1DM patients presenting acceptable clinical control relative to age- and sex-matched controls (Hannon-Fletcher et al. 2000). Collectively, these studies suggest the impairment of the antioxidant defense system and an increase in oxidative stress and DNA damage in T1DM patients, even in subjects presenting a satisfactory glycemic control.

Results from another study indicated that serum copper-to-zinc ratio (reduced levels of zinc and elevated levels of copper indicate the presence of oxidative stress), serum SOD activity, blood and urinary MDA, as well as urinary 8-OHdG were significantly higher in young T1DM patients (in particular in poorly-controlled patients (HbA1c $\geq$ 9%)) compared with the control group (Lin et al. 2014). It is important to note that the findings regarding SOD activity contradicts the aforementioned results from the work of Dinçer et al. (2003). A plausible explanation given by Lin et al. (2014) for the increased SOD activity in T1DM patients observed in their work would be that it might compensate for the oxidative stress in these individuals. Interestingly, the levels of serum copper, serum copper-to-zinc ratio, urinary MDA, and urinary 8-OHdG were significantly elevated in the poorly-controlled patients relative to the optimal-and-suboptimal-glycemic-control patients (HbA1c < 9%) (Lin et al. 2014). Taken together, these results corroborate the previously cited works (except for the SOD activity findings) and also indicate that poor glycemic control is associated with augmented oxidative stress and DNA damage in T1DM patients.

9.2.2 Transcriptional Expression of Protein-Coding Genes and MicroRNAs Related to Oxidative Stress and DNA Repair in T1DM

A number of large-scale transcriptional profiling studies has been performed to compare gene expression displayed by T1DM patients relative to healthy subjects by carrying out microarray experiments. A study investigated gene expression profiles of endothelial progenitor cells (EPC), which were *in vitro* differentiated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), from T1DM patients pre- and post-supplementation with folic acid (FA, a B-vitamin with antioxidant properties) and non-diabetic individuals (van Oostrom et al. 2009). The 1591 genes found to be differentially expressed between T1DM patients pre-FA treatment and the control group were classified into Gene Ontology (GO) terms, including 'response to stress' and 'response to hypoxia'. Among the up-regulated genes (related to these two terms) detected in EPC from T1DM patients were dual oxidase 2 (*DUOX2*), a NADPH oxidase that can produce superoxide, nitric oxide synthase 2A (*NOS2A*) that is capable of generating nitric oxide, thioredoxin reductase 2 (*TXNRD2*), a major enzyme involved in the control of the intracellular redox balance, lactoperoxidase (*LPO*) and NADPH oxidase organizer 1 (*NOXO1*), which is associated with the generation of ROS. Importantly, FA treatment notably affected the EPC transcriptome, resulting in normalization of gene expression in diabetic EPC to levels similar to those exhibited by healthy individuals. In fact, 513 of the 1591 genes found differentially expressed in the patients *versus* the control group returned to control levels after FA supplementation. As expected, FA altered the expression of oxidative stress-associated genes in EPC, with four (*DUOX2*, *NOS2A*, *NOXO1* and *LPO*) being included among the 513 normalized genes. In addition, another differentially expressed gene (down-regulated) in T1DM patients that was normalized by FA treatment was the transcription factor (TF) V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (*MAFF*) (van Oostrom et al. 2009). This TF can bind to another TF, Nrf2, which, in turn, induces the expression of ARE-dependent genes (Katsuoka et al. 2005, Blank 2008).

Irvine et al. (2012) investigated whether there were differences in gene expression of purified peripheral blood CD14⁺ monocytes between recently diagnosed T1DM children and adult healthy controls by whole-genome microarrays, followed by validation of a group of genes by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Results indicated that the monocyte expression profiles exhibited by the patients clustered into two subgroups, with one of them (group B) clustering separate from the other patient subgroup and the healthy controls. At diagnosis, both subgroups of patients were clinically identical, however, group B presented increased levels of HbA1c 3 and 6 months after diagnosis and needed significantly higher insulin doses during the first year of the disease. Expression profiles in monocytes from patients belonging to group B indicated cellular activation through stress, including the unfolded protein response (UPR), which results from endoplasmic reticulum (ER) stress (*IRE1*, *GRP78*, *DDIT3*, *XBP1*). Furthermore, *HIF1A*, a major mediator of oxidative stress, and several of its targets (*DDIT4*, *PFKFB3*, and *ADM*) (Ruiz-García et al. 2011, Geiger et al. 2011) were up-regulated in group B monocytes, while genes that play a role in mitochondrial oxidative

phosphorylation (*PDHB*, *MDH1*, *IDH1*, *SDHC*, *ACLY*) were found repressed. Moreover, mitochondrion was the most significantly enriched cellular component term for the down-regulated genes in group B. In addition, repression of many genes related to cellular antioxidant pathways (*CAT*, *G6PD*, *OXR1*, *PRDX1*, *PRDX3*) were observed in group B monocytes, indicating perturbation of protective systems (Irvine et al. 2012). The biological processes oxidative and ER stresses are closely associated. Oxidative stress can promote ER stress, and in response to that, ER activates the UPR transcriptional program (Martinon and Glimcher 2011). Failure of the UPR results in prolonged ER stress, which, in turn, triggers apoptosis and inflammation. Accordingly, genes controlling apoptosis were enriched in monocytes from group B patients. Hence, collectively, these findings imply that the group B monocytes are intrinsically susceptible to stress or exist in a stressful environment, as well as indicate the persistence of ER stress (Irvine et al. 2012).

Intriguingly, Stechova and co-workers (2011) compared gene expression profiles of freshly isolated PMBCs from patients with T1DM, their first-degree relatives with higher genetic risk of developing the disease, and non-diabetic individuals by the microarray technology. They observed a clear difference between the expression profiles of relatives of patients (in particular the autoantibody-negative ones) and healthy controls. Moreover, the highest number of differentially activated cell signalling processes (99 pathways) was reported in the comparison between the relatives, regardless of autoantibody status, and the control group. Interestingly, DNA damage and oxidative stress were among those pathways (Stechova et al. 2011). Thus, these findings showed that non-diabetic relatives of T1DM patients also present alterations in the expression of genes.

Regarding the target tissue, whole-genome transcript expression for four T1DM pancreases (collected at different T1DM stages) and for purified islets from two of them was compared with that of the control group by carrying out microarray experiments, followed by qPCR validation of a group of genes (Planas et al. 2010). In agreement with the aforementioned studies performed in peripheral blood cells, Planas and colleagues (2010) observed changes in the expression of oxidative stress genes (all up-regulated), including metallothioneins, such as *MT1M* (in the four cases and in purified islets) and *SOD2*, ceruloplasmin and thioredoxin interacting protein (case 1, pancreas and islets). Moreover, islets shared some alterations in the expression of apoptosis-related genes, such as repression of pro-apoptotic genes (*MLLT11*, *PRUNE2*, and *NLRP1*).

With respect to the expression of non-coding protein genes, microRNAs (miRNAs) have been indicated both as potential biomarkers for the earlier diagnosis of diabetes and as therapeutic targets for the treatment of this disorder (Mao et al. 2013). miRNAs are endogenous non-coding RNA molecules of approximately 22 nucleotides that are involved in the post-transcriptional regulation of protein-coding gene expression (Bartel 2004) by base-pairing to specific sites in the 5' untranslated regions (UTR) (Grey et al. 2010, Helwak et al. 2013), coding sequences (Hafner et al. 2010, Helwak et al. 2013, Reczko et al. 2012), and 3' UTRs of the mRNA targets; in this way, miRNAs lead to the degradation and/or translational repression of their targets (Bartel 2009, Krol et al. 2010, Lee et al. 1993, Lim, Lau et al. 2005, Wightman et al. 1993). Recently, we compared the miRNA expression profiles displayed by PBMCs from T1DM patients with those exhibited by PBMCs from healthy non-diabetic controls by performing microarray experiments (Takahashi et al. 2014). In this study, we were able to identify a set of 44 differentially expressed miRNAs (35 induced and nine repressed) that clearly stratified patients with T1DM from the healthy subjects. After target prediction, results pointed to 10,827 and 6636 potential targets of the up- and down-regulated miRNAs, respectively; of note, a total of 85 and 75 genes implicated in DNA repair and response to oxidative stress, respectively, are potential targets of the 44 differentially modulated miRNAs in T1DM (unpublished data).

Taken together, these works on the whole-transcript expression in T1DM patients are consistent with the aforementioned studies that have detected elevated oxidative stress and DNA damage levels, as well as a perturbation in the antioxidant defense mechanisms in these individuals (section 16.2.1). Moreover, genes involved in DNA repair and response to oxidative stress are putative targets of a set of miRNAs that clearly distinguished T1DM patients from healthy individuals. Finally, altogether, these works support the hypothesis that patients with T1DM respond to the increased oxidative stress and DNA lesions by changing their gene expression profiles.

9.3 T2DM

T2DM represents approximately 90% of all diagnosed cases of diabetes (ADA 2011). The disease is mainly characterized by resistance to insulin action and also by deficiency in the secretion of this hormone, presenting great correlation with aging, obesity, and physical inactivity (Golay and Ybarra 2005). It is not known whether during the development of the disease it is the insulin resistance or the secretion deficiency that occurs first; however, insulin resistance appears as a crucial factor, especially when related to obesity, given the fact that about 60 to 90% of all T2DM patients are or were obese (Gerich 1999, Golay and Ybarra 2005, Stumvoll et al. 2005).

Obesity causes a chronic inflammatory response in the adipose tissue, characterized by an abnormal production of cytokines, which include mostly molecules playing roles in stress response processes (Sethi and Hotamisligil 1999, Lebrun and Van Obberghen 2008). One of these cytokines is the Tumor Necrosis Factor - alpha (TNF- α), which is released at large amounts by adipocytes and acts on the insulin receptor, inhibiting its tyrosine kinase activity, which culminates in insulin resistance (Sethi and Hotamisligil 1999, Kohn et al. 2005). In addition, excess body fat leads to an increase in the number of fatty acid molecules in the blood. Consequently, a preferential use of lipids as an energy source occurs, especially by muscles, which prevents glucose utilization and glycogen synthesis, leading to hyperglycemia. Furthermore, there is an increase in insulin secretion to compensate for the insulin receptor resistance, and this condition gradually leads to the development of the disease (Lam et al. 2003, Golay and Ybarra 2005).

The biochemical mechanisms and physiological processes that characterize T2DM are not well understood. Some susceptibility genes have been identified, including genes related to cellular metabolism, such as PPAR gamma (*PPARG*) (Barroso et al. 2006), *KCNJ* (Schwanstecher and Schwanstecher 2002), and *CAPN10* (Cox et al. 2004), as well as the transcription factors *HNF4A* (Damcott et al. 2004, Hara et al. 2006) and *TCF7L2* (Florez et al. 2003, Barroso et al. 2006). Other genes, such as *ENPP1*, *RBP4*, and *SIRT1* are strong T2DM candidate genes, although they still need to be validated (Freeman and Cox 2006). The protein encoded by the *ENPP1* gene acts both on insulin resistance and on obesity development (Meyre et al. 2005). High concentrations of RBP4 protein promote systemic insulin resistance and when present at low levels, RBP4 promotes an increased sensitivity to the hormone (Yang et al. 2005). The overexpression of *SIRT1* protein increases the secretion of insulin by β -cells, presumably due to increased efficiency in ATP production by the oxidative phosphorylation process (Moynihan et al. 2005).

Currently, the treatment for patients with T2DM is limited to drug therapies that improve disease conditions, such as insulin resistance. However, these drugs do not aim to restore the normal glucose metabolism, an event that exposes patients to the risk of disease complications. Treatment for T2DM also aims to reduce hyperglycemia by two main mechanisms: increased secretion of insulin by the pancreas or decreased production of glucose by the liver. Metformin is one of the most used drugs to treat T2DM patients. PPAR gamma antagonists, which act by increasing the sensitivity of insulin receptor, have also been used (Moller 2001). Still, sulphonylureas, thiazolidinediones, and insulin are also among the medications indicated for the treatment and glycemic control of T2DM patients (Ismail-Beigi 2012). However, treatment is complicated, mainly due to the lack of control of insulin secretion performed by the β -cells, which accurately adjust the amount of insulin secreted in accordance with the needs of the organism. Therefore, patients often have episodes of hypoglycemia and hyperglycemia, both with serious consequences for the diabetic patient, because the former can lead to coma, while the latter can lead to blindness, kidney failure, and vascular diseases (Taylor 1999, Kruger et al. 2006).

9.3.1 Oxidative Stress and DNA Damage in T2DM

In T2DM, hyperglycemia contributes significantly to the production of free radicals. Moreover, the antioxidant defense mechanisms are not able to compensate or neutralize the amount of radicals formed, since there is evidence of a reduced activity of antioxidant enzymes in these patients, such as SOD, CAT, and glutathione reductase (GSR) (Seghrouchni et al. 2002). Thus, an increase in ROS generation and hence increased oxidative damage occur (Nishikawa et al. 2000, Blasiak et al. 2004). Additionally, as previously mentioned, there is the contribution of other processes, such as formation of AGEs that initiate cascades related to oxidative damage and are toxic to the cells, including pancreatic β -cells (Piperi et al. 2012).

As a consequence of oxidative stress, T2DM patients also show increased levels of lipid peroxidation products when compared with healthy individuals (Slatter et al. 2000). Accordingly, Abou-Seif and Youssef (2004) performed a study evaluating a series of markers in diabetic patients compared with healthy individuals, including lipid peroxidation products (MDA), antioxidants (GSH, SOD, and CAT) as well as oxidation protein products and AGEs markers. As a result, the authors found in the diabetic patient group decreased levels of the three antioxidants and increased levels of MDA, oxidation protein products, and AGEs, providing further support to the information aforementioned.

Hereupon, glycemic control has beneficial effects as it reduces the harmful effects of hyperglycemia in diabetic patients (Stolar et al. 2008, Ismail-Beigi 2012). Concerning the importance of glycemic control, Cakatay (2005) verified protein oxidation using different markers comparing hyperglycemic and non-hyperglycemic T2DM patients, both groups without any comorbidity. The author found higher levels of protein oxidation in hyperglycemic T2DM patients. As patients had no comorbidities, high protein oxidation in these patients indicates that oxidative stress may not be a result of complications of the disease, but it can probably contribute to the development of T2DM. Lodovici et al. (2008) also conducted a comparative study between hyperglycemic and non-hyperglycemic T2DM patients, but focusing on the antioxidant defense status. The authors observed that patients with elevated glucose levels exhibited decreased antioxidant condition when compared with non-hyperglycemic patients. Therefore, these studies suggest that oxidative stress resulting from hyperglycemia is an important factor involved in the decline of antioxidant defense and in the increase in oxidative damage, being necessary a proper control of both, blood glucose levels and free radical production, thus, avoiding the action of the latter on different macromolecules, such as lipids and proteins.

Regarding the generation of DNA damage, it is well known that the exposure of cells to oxidative stress as a consequence of the increased generation of ROS induces higher DNA damage levels in PBMCs from diabetic patients when compared with healthy individuals (Bonnetfont-Rousselot et al. 2000, Lee and Wei 2007, Song et al. 2007, da Silva et al. 2013). Furthermore, Binici et al. (2013) verified an increased genomic instability in T2DM patients. In addition, the efficiency of DNA repair was compared between a group of poorly controlled T2DM patients and a group of healthy subjects, by measuring DNA damage levels (comet assay) caused by hydrogen peroxide and by doxorubicin (Blasiak et al. 2004); their results demonstrated that besides having higher baseline DNA damage than healthy subjects, when exposed to mutagens, T2DM patients also showed a lower efficiency of DNA repair, although both groups were able to repair the damage.

Even in T2DM patients with good glycemic control, the lack of proper physiological adjustment of insulin secretion, as present in healthy individuals (Kruger et al. 2006), may lead these patients to experience periods of hyperglycemia, triggering oxidative stress as a consequence. Even though this might not be enough to cause significant damage to the nuclear DNA, there is still the possibility of generation of damage in the mitochondrial DNA (mtDNA), since cellular respiration in mitochondria makes this organelle the site of increased production of free radicals inside the cell (Fernandez-Sanchez et al. 2011). Some studies suggest that DNA damage can be repaired in the mitochondria less efficiently than in the nucleus (Arnheim and Cortopassi 1992, Lim, Jeyaseelan et al. 2005). Santos et al. (2003) found that fibroblast strains exposed to hydrogen peroxide also showed differences in nuclear DNA and mtDNA efficiency of repair. Under certain conditions, damage in the nuclear DNA was fully repaired after a certain period of time, while damage in mtDNA was not significantly repaired, increasing apoptosis; these findings suggest the existence of a threshold in the mitochondrial repair and when it is crossed, mechanisms of cell death are triggered.

9.3.2 Alterations of Transcriptional Expression Profiles in T2DM

Since the initial work of Schena et al. (1995), the microarray technique became a common and important tool in medical and biological research. Thus, in the last years, many studies used this technology to analyze the gene expression profiles exhibited by T2DM patients in order to reveal new genes and pathways involved in the disease. Takamura et al. (2007) compared the gene expression profiles of PBMCs from T2DM patients with those from non-diabetic subjects by analyzing the modulation of specific gene set categories. The authors found that genes related to the c-Jun N-

terminal kinase (JNK) and mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) pathways (possibly related to stress response) were differentially modulated in T2DM patients. Palsgaard et al. (2009) compared the gene expression profiles of muscle biopsies from T2DM patients with those from their healthy first degree relatives in an attempt to investigate if the latter have an increased risk of developing the disorder. Their findings indicated that the up-regulated genes in the group of T2DM relatives were involved in insulin signaling, which, according to the author, could be a compensatory mechanism for a reduced insulin signaling activity. Bikopoulos et al. (2008) analyzed the gene expression profiles of human pancreatic islets under chronic exposure to free fatty acids; aside from showing a significantly reduced glucose-stimulated insulin secretion and increased ROS generation, the pancreatic islets chronically exposed to oleate also presented altered expression of 40 genes; these genes were related to the oleate metabolism inflammation, and also to antioxidant defense (which were up-regulated), highlighting the importance of free fatty acids as risk factors for the development of T2DM.

Our group also conducted a study comparing the transcriptional expression patterns exhibited by PBMCs from T2DM patients with those from healthy subjects, focusing on pathways such as oxidative stress response, DNA repair, response to hypoxia, inflammation, fatty acid processing, and immune response (Manoel-Caetano et al. 2012). We obtained a list of 92 differentially expressed genes (52 up-regulated and 40 down-regulated) in diabetic patients compared to the control group, and these genes were associated with the six aforementioned biological processes; among them, genes related to oxidative stress responses and hypoxia (*OXR1*, *SMG1*, and *UCP3*) were highly up-regulated, possibly in an attempt to deal with increased oxidative stress. Concerning the down-regulated genes, many were involved in inflammation, immune response and DNA repair (including *SUMO1*, *ATRX*, and *MORF4L2*). The down-regulation of several DNA repair genes is in agreement with the decreased efficiency of DNA repair verified in T2DM patients (Blasiak et al. 2004, Pacal et al. 2011). In another study conducted by Marselli et al. (2010), genes related to glucotoxicity, oxidative stress (up-regulated), cell cycle, apoptosis, or ER stress were found differentially expressed in β -cell-enriched samples obtained from T2DM patients relative to control individuals.

Lately, the role of ER stress has been studied in T2DM regarding both the pathogenesis of the disease and its consequences. The ER is the major organelle responsible for regulating not only the synthesis of proteins but also its folding, maturation, and transport, representing the most significant sensor of nutrients in the cell and a major coordinator of metabolic responses. The ER maintains a controlled balance between the synthesis and proper protein folding (Ron and Walter 2007, Piperi et al. 2012). However, several conditions can break this homeostatic balance, such as excess of nutrients, insulin resistance, increased levels of ROS, and inflammation related to obesity (Scheuner et al. 2005). The disturbance of this homeostasis leads to an accumulation of misfolded proteins in the organelle, either by an increased rate of protein synthesis, or by alterations in the ER milieu, compromising the efficiency of protein folding. Regardless the case, the UPR response is triggered to restore protein homeostasis (Sano and Reed 2013, Biden et al. 2014). Mainly three proteins are responsible for the activation of UPR response: inositol-requiring protein-1 α (IRE1 α), protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK), and activating transcription factor 6 (ATF6). Under normal conditions, the Binding immunoglobulin Protein (BiP) chaperone is bound to the luminal regions of the PERK and ATF6 proteins, maintaining an inactive conformation. During ER stress, as a response to the accumulation of misfolded proteins, BiP is released from PERK and ATF6, in order to assist with the proper protein folding (Gardner and Walter 2011, Sano and Reed 2013). Differently, IRE1 α seems to become active when bound to misfolded proteins. The activation of these three proteins leads to signaling pathways which diminish the accumulation of proteins in the ER. This is accomplished by the translation inhibition of a series of mRNAs (which restricts the protein influx into the ER) and by promoting the transport of misfolded proteins outside the ER, where they will be ubiquitinated and directed to degradation (Sano and Reed 2013).

UPR has been related to the carbohydrate metabolism, according to studies in T2DM. ER stress can inhibit the suppression of gluconeogenic enzymes; as a consequence, there is an increase in the production of glucose by the liver, leading to obesity and the development of diabetes (Kimura et al. 2012). Wang et al. (2009) also showed that acute ER stress promoted the activation and nuclear entry of CRTC2, which, in turn, induced the expression of ATF6 and activated gluconeogenesis. Insulin resistance mechanism was also related to ER stress as a consequence of a high fat diet. The XBP-1 protein binds to promoters of genes related to UPR and to the ER assisted degradation, in order to restore protein homeostasis in the ER (Sano and Reed 2013). According to Hage Hassan et

al. (2012), silencing XBP-1 in C2C12 cells and human myotubes increased the sensitivity to ER stress and insulin resistance, as a consequence of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) degradation. In addition, ER stress provokes IRS-1 serine phosphorylation, disassembling it from the insulin receptor and increasing insulin resistance (Bailly-Maitre et al. 2010). Likewise, pancreatic β -cell death was related to ER stress and UPR response, due to the high insulin demand, which causes an increased dependence of ER functioning, to ensure proper synthesis and insulin folding (Sano and Reed 2013). For instance, Back et al. (2009) showed that the absence of eIF2 α phosphorylation in mice β -cells caused dysregulated proinsulin translation, increased oxidative damage, and defective ER trafficking of proteins and apoptosis.

There is evidence that hyperglycemia is also associated with ER stress. Excess glucose may react with other molecules such as lipids and proteins, leading to AGEs formation, thereby resulting in alterations in the ER homeostasis (Inagi 2011, Piperi et al. 2012). The effects of ongoing stress to ER have also been associated with the development of inflammation and also with various T2DM complications (Hayashi et al. 2005, Piperi et al. 2012). As such, Osowski et al. (2012) reported that ER stress induced thioredoxin interacting protein (TXNIP) through IRE1 α and PERK action in mice and human pancreatic β -cells. TXNIP, in turn, promoted IL-1 β production in these cells. Some other studies have demonstrated the importance of ER stress to T2DM. Casas et al. (2007) evaluated the influence of amyloid polypeptide, which is toxic to pancreatic β -cells, on the expression profiles of MIN6 cells and primary cultures of human pancreatic islets. The authors observed not only the influence of amyloid polypeptide aggregation on the induction of genes related to ER stress, but also an impairment of the proteasome function, which contributed to apoptosis.

Komura et al. (2010) studied the immune-mediated response by comparing the transcriptional expression profiles of PBMCs from T2DM patients *versus* healthy individuals. The authors detected an elevated expression of markers of ER stress in the T2DM group. Finally, Iwasaki et al. (2014) verified the influence of ATF4, a transcription factor activated after metabolic stresses (including ER stress), on the inflammation mediated by free fatty acids. Using macrophages, the authors provided evidence that the ATF4 pathway was activated by free fatty acids, linking metabolic stress to inflammation process in these cells.

Altogether, the information in the literature regarding transcriptional expression profiles highlights not only altered pathways in T2DM, such as inflammation, oxidative stress, immune response, and ER stress, but also establishes a link between biological processes. In addition, the use of microarrays and other techniques for whole-genome profiling brings forth a large amount of data, whose analysis may reveal new altered pathways in T2DM, increasing our knowledge about the disease and also providing new therapy possibilities.

9.4 Conclusions

Diabetes mellitus is a group of chronic metabolic diseases that has a great impact on public health. A number of studies have demonstrated a link between the two main types of diabetes, T1DM and T2DM, and oxidative stress, since the latter may ultimately result in β -cell damage as well as can be a consequence of diabetes itself due to hyperglycemia. In agreement with that, increased levels of oxidative stress markers and DNA damage and impaired antioxidant system have been reported in patients suffering from T1DM or T2DM. Thus, it is expected that these patients respond to those insults in many ways, including via alterations in the expression of genes, which in fact have been described in this chapter.

Figures

Fig. 9.1 The ROS pathway. ROS can be generated by both endogenous and exogenous sources. Protective mechanisms exist to maintain ROS homeostasis. However, oxidative stress, which is the imbalance between the levels of ROS and those of antioxidants, favoring the former, may occur. Oxidative stress can damage DNA, generating several types of lesions, which, in turn, can lead to genomic instability. Because of that, cells are equipped with many DNA repair mechanisms. NOXs, NADPH oxidases; ROS, reactive oxygen species; $O_2^{\cdot-}$, superoxide radical; $OH^{\cdot}$, hydroxyl radical; H_2O_2 , hydrogen peroxide; $O_2^{\cdot-}$, superoxide; $ONOO^{\cdot-}$, peroxynitrite; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase enzyme; GSH, reduced glutathione; Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; ARE, antioxidant response elements; SSB, single strand break; DSB, double strand break; BER, base-excision repair; NER, nucleotide-excision repair; MMR, mismatch repair; HR, homologous recombination; NHEJ, non-homologous end-joining.

Fig. 9.2 Crosstalk between oxidative stress and the two main categories of Diabetes Mellitus. Oxidative stress may be a contributing factor to diabetes, but it can also be a consequence of the latter due to the disturbance of several mechanisms as a result of hyperglycemia. T1DM, Type 1 Diabetes Mellitus; T2DM, Type 2 Diabetes Mellitus; AGEs, advanced glycation end-products.

References

- Abou-Seif MA, Youssef AA (2004) Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta* 346:161-170.
- ADA (American Diabetes Association) (2011) Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care* 34 Suppl 1:S11-61.
- ADA (American Diabetes Association) (2013) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 36 Suppl 1:S67-74.
- Agbaje IM, McVicar CM, Schock BC et al. (2008) Increased concentrations of the oxidative DNA adduct 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine in the germ-line of men with type 1 diabetes. *Reprod Biomed Online* 16:401-409.
- Ahmad FK, He Z, King GL (2005) Molecular targets of diabetic cardiovascular complications. *Curr Drug Targets* 6:487-494.
- Arnheim N, Cortopassi G (1992) Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues. *Mutat Res* 275:157-167.
- Back SH, Scheuner D, Han J et al. (2009) Translation attenuation through eIF2 α phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in beta cells. *Cell Metab* 10:13-26.
- Bailly-Maitre B, Belgardt BF, Jordan SD et al. (2010) Hepatic Bax inhibitor-1 inhibits IRE1 α and protects from obesity-associated insulin resistance and glucose intolerance. *J Biol Chem* 285:6198-6207.
- Barrett JC, Clayton DG, Concannon P et al. (2009) Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 41:703-707.
- Barroso I, Luan J, Sandhu MS et al. (2006) Meta-analysis of the Gly482Ser variant in PPARGC1A in type 2 diabetes and related phenotypes. *Diabetologia* 49:501-505.
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.

- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215-233.
- Bell GI, Horita S, Karam JH (1984) A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 33:176-183.
- Biden TJ, Boslem E, Chu KY, Sue N (2014) Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, beta cell failure, and type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab.* Advance online publication. doi: 10.1016/j.tem.2014.02.003.
- Bikopoulos G, da Silva Pimenta A, Lee SC et al. (2008) Ex vivo transcriptional profiling of human pancreatic islets following chronic exposure to monounsaturated fatty acids. *J Endocrinol* 196:455-464.
- Binici DN, Karaman A, Coskun M et al. (2013) Genomic damage in patients with type-2 diabetes mellitus. *Genet Couns* 24:149-156.
- Blank V (2008) Small Maf proteins in mammalian gene control: mere dimerization partners or dynamic transcriptional regulators? *J Mol Biol* 376:913-925.
- Blasiak J, Arabski M, Krupa R et al. (2004) DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res* 554:297-304.
- Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J (2000) Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 26:163-176.
- Bottini N, Musumeci L, Alonso A et al. (2004) A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 36:337-338.
- Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820.
- Burren OS, Adlem EC, Achuthan P et al. (2011) T1DBase: update 2011, organization and presentation of large-scale data sets for type 1 diabetes research. *Nucleic Acids Res* 39:D997-1001.
- Cakatay U (2005) Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab* 31:551-557.
- Casas S, Gomis R, Gribble FM et al. (2007) Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway is a downstream endoplasmic reticulum stress response induced by extracellular human islet amyloid polypeptide and contributes to pancreatic beta-cell apoptosis. *Diabetes* 56:2284-2294.
- Codoñer-Franch P, Pons-Morales S, Boix-García L, Valls-Bellés V (2010) Oxidant/antioxidant status in obese children compared to pediatric patients with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* 11:251-257.
- Cooper JD, Smyth DJ, Walker NM et al. (2011) Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes. *Diabetes* 60:1624-1631.
- Cox NJ, Hayes MG, Roe CA et al. (2004) Linkage of calpain 10 to type 2 diabetes: the biological rationale. *Diabetes* 53 Suppl 1:S19-25.
- da Silva BS, Rovaris DL, Bonotto RM et al. (2013) The influence on DNA damage of glycaemic parameters, oral antidiabetic drugs and polymorphisms of genes involved in the DNA repair system. *Mutagenesis* 28:525-530.
- Damcott CM, Hoppman N, Ott SH et al. (2004) Polymorphisms in both promoters of hepatocyte nuclear factor 4-alpha are associated with type 2 diabetes in the Amish. *Diabetes* 53:3337-3341.
- Dinçer Y, Akçay T, İlkova H et al. (2003) DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with Type I diabetes mellitus. *Mutat Res* 527:49-55.
- Dizdaroglu M (2012) Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett* 327:26-47.

- Drews G, Krippeit-Drews P, Düfer M (2010) Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch* 460:703-718.
- Edeas M, Attaf D, Mailfert AS et al. (2010) Maillard reaction, mitochondria and oxidative stress: potential role of antioxidants. *Pathol Biol (Paris)* 58:220-225.
- Fernandez-Sanchez A, Madrigal-Santillan E, Bautista M et al. (2011) Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 12:3117-3132.
- Florez JC, Hirschhorn J, Altshuler D (2003) The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 4:257-291.
- Freeman H, Cox RD (2006) Type-2 diabetes: a cocktail of genetic discovery. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2:R202-209.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W et al. (2006) DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington, D.C.
- Gardner BM, Walter P (2011) Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* 333:1891-1894.
- Geiger K, Leiherer A, Muendlein A et al. (2011) Identification of hypoxia-induced genes in human SGBS adipocytes by microarray analysis. *PLoS One* 6:e26465.
- Gerich JE (1999) Is insulin resistance the principal cause of type 2 diabetes? *Diabetes Obes Metab* 1:257-263.
- Golay A, Ybarra J (2005) Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:649-663.
- Goodarzi MT, Navidi AA, Rezaei M, Babahmadi-Rezaei H (2010) Oxidative damage to DNA and lipids: correlation with protein glycation in patients with type 1 diabetes. *J Clin Lab Anal* 24:72-76.
- Grey F, Tirabassi R, Meyers H et al. (2010) A viral microRNA down-regulates multiple cell cycle genes through mRNA 5'UTRs. *PLoS Pathog* 6:e1000967.
- Hafner M, Landthaler M, Burger L et al. (2010) Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* 141:129-141.
- Hage Hassan R, Hainault I, Vilquin JT et al. (2012) Endoplasmic reticulum stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells. *Diabetologia* 55:204-214.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford.
- Hannon-Fletcher MP, O'Kane MJ, Moles KW et al. (2000) Levels of peripheral blood cell DNA damage in insulin dependent diabetes mellitus human subjects. *Mutat Res* 460:53-60.
- Hara K, Horikoshi M, Kitazato H et al. (2006) Hepatocyte nuclear factor-4alpha P2 promoter haplotypes are associated with type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 55:1260-1264.
- Hata I, Kaji M, Hirano S et al. (2006) Urinary oxidative stress markers in young patients with type 1 diabetes. *Pediatr Int* 48:58-61.
- Hayashi T, Saito A, Okuno S et al. (2005) Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:41-53.
- Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, Tollervey D (2013) Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* 153:654-665.
- IDF (2013) The IDF Diabetes Atlas. International Diabetes Federation. Sixth Edition ed. Brussels. <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Accessed 14 Mar 2014.

- Inagi R (2011) Inhibitors of advanced glycation and endoplasmic reticulum stress. *Methods Enzymol* 491:361-380.
- Irvine KM, Gallego P, An X et al. (2012) Peripheral blood monocyte gene expression profile clinically stratifies patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetes* 61:1281-1290.
- Ismail-Beigi F (2012) Clinical practice. Glycemic management of type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 366:1319-1327.
- Iwasaki Y, Suganami T, Hachiya R et al. (2014) Activating transcription factor 4 links metabolic stress to interleukin-6 expression in macrophages. *Diabetes* 63:152-161.
- Jiang F, Zhang Y, Dusting GJ (2011) NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol Rev* 63:218-242.
- Kalyanaraman B (2013) Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* 1:244-257.
- Katsuoka F, Motohashi H, Ishii T et al. (2005) Genetic evidence that small maf proteins are essential for the activation of antioxidant response element-dependent genes. *Mol Cell Biol* 25:8044-8051.
- Kimura K, Yamada T, Matsumoto M et al. (2012) Endoplasmic reticulum stress inhibits STAT3-dependent suppression of hepatic gluconeogenesis via dephosphorylation and deacetylation. *Diabetes* 61:61-73.
- Kohn LD, Wallace B, Schwartz F, McCall K (2005) Is type 2 diabetes an autoimmune-inflammatory disorder of the innate immune system? *Endocrinology* 146:4189-4191.
- Komura T, Sakai Y, Honda M et al. (2010) CD14+ monocytes are vulnerable and functionally impaired under endoplasmic reticulum stress in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 59:634-643.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11:597-610.
- Kruger DF, Martin CL, Sadler CE (2006) New insights into glucose regulation. *Diabetes Educ* 32:221-228.
- Lam TK, Carpentier A, Lewis GF et al. (2003) Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E863-873.
- Lebrun P, Van Obberghen E (2008) SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiol (Oxf)* 192:29-36.
- Lee HC, Wei YH (2007) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 232:592-606.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854.
- Lenzen S (2008) Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* 36:343-347.
- Lim KS, Jeyaseelan K, Whiteman M et al. (2005) Oxidative damage in mitochondrial DNA is not extensive. *Ann N Y Acad Sci* 1042:210-220.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P et al. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433:769-773.
- Lin CC, Huang HH, Hu CW et al. (2014) Trace elements, oxidative stress and glycemic control in young people with type 1 diabetes mellitus. *J Trace Elem Med Biol* 28:18-22.
- Lodovici M, Giovannelli L, Pitozzi V et al. (2008) Oxidative DNA damage and plasma antioxidant capacity in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Mutat Res* 638:98-102.

- Lowe CE, Cooper JD, Brusko T et al. (2007) Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet* 39:1074-1082.
- Manoel-Caetano FS, Xavier DJ, Evangelista AF et al. (2012) Gene expression profiles displayed by peripheral blood mononuclear cells from patients with type 2 diabetes mellitus focusing on biological processes implicated on the pathogenesis of the disease. *Gene* 511:151-160.
- Mao Y, Mohan R, Zhang S, Tang X (2013) MicroRNAs as pharmacological targets in diabetes. *Pharmacol Res* 75:37-47.
- Marselli L, Thorne J, Dahiya S et al. (2010) Gene expression profiles of Beta-cell enriched tissue obtained by laser capture microdissection from subjects with type 2 diabetes. *PLoS One* 5:e11499.
- Martinon F, Glimcher LH (2011) Regulation of innate immunity by signaling pathways emerging from the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Immunol* 23:35-40.
- Meyre D, Bouatia-Naji N, Tounian A et al. (2005) Variants of ENPP1 are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes. *Nat Genet* 37:863-867.
- Moller DE (2001) New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414:821-827.
- Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM et al. (2005) Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab* 2:105-117.
- Nathan C, Cunningham-Bussel A (2013) Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* 13:349-361.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL et al. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404:787-790.
- Nisticò L, Buzzetti R, Pritchard LE et al. (1996) The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet* 5:1075-1080.
- Osowski CM, Hara T, O'Sullivan-Murphy B et al. (2012) Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced beta cell death through initiation of the inflammasome. *Cell Metab* 16:265-273.
- Pacal L, Varvarovska J, Rusavy Z et al. (2011) Parameters of oxidative stress, DNA damage and DNA repair in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Arch Physiol Biochem* 117:222-230.
- Palsgaard J, Brons C, Friedrichsen M et al. (2009) Gene expression in skeletal muscle biopsies from people with type 2 diabetes and relatives: differential regulation of insulin signaling pathways. *PLoS One* 4:e6575.
- Piperi C, Adamopoulos C, Dalagiorgou G et al. (2012) Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 97:2231-2242.
- Planas R, Carrillo J, Sanchez A et al. (2010) Gene expression profiles for the human pancreas and purified islets in type 1 diabetes: new findings at clinical onset and in long-standing diabetes. *Clin Exp Immunol* 159:23-44.
- Rains JL, Jain SK (2011) Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 50:567-575.
- Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P et al. (2012) Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics* 28:771-776.
- Robertson RP, Harmon JS (2007) Pancreatic islet beta-cell and oxidative stress: the importance of glutathione peroxidase. *FEBS Lett* 581:3743-3748.

- Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:519-529.
- Ruiz-García A, Monsalve E, Novellasedemunt L et al. (2011) Cooperation of adenosine with macrophage Toll-4 receptor agonists leads to increased glycolytic flux through the enhanced expression of PFKFB3 gene. *J Biol Chem* 286:19247-19258.
- Sano R, Reed JC (2013) ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1833:3460-3470.
- Santos JH, Hunakova L, Chen Y et al. (2003) Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. *J Biol Chem* 278:1728-1734.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-470.
- Scheuner D, Vander Mierde D, Song B et al. (2005) Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nat Med* 11:757-764.
- Schwanstecher C, Schwanstecher M (2002) Nucleotide sensitivity of pancreatic ATP-sensitive potassium channels and type 2 diabetes. *Diabetes* 51 Suppl 3:S358-362.
- Seghrouchni I, Draï J, Bannier E et al. (2002) Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta* 321:89-96.
- Sethi JK, Hotamisligil GS (1999) The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 10:19-29.
- Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ (2000) The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia* 43:550-557.
- Song F, Jia W, Yao Y et al. (2007) Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)* 112:599-606.
- Stechova K, Kolar M, Blatny R et al. (2011) Healthy first degree relatives of patients with type 1 diabetes exhibit significant differences in basal gene expression pattern of immunocompetent cells compared to controls: expression pattern as predeterminant of autoimmune diabetes. *Scand J Immunol* 75:210-219.
- Stolar MW, Hoogwerf BJ, Gorshow SM et al. (2008) Managing type 2 diabetes: going beyond glycemic control. *J Manag Care Pharm* 14:s2-19.
- Storr SJ, Woolston CM, Zhang Y, Martin SG (2013) Redox environment, free radical, and oxidative DNA damage. *Antioxid Redox Signal* 18:2399-2408.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW (2005) Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365:1333-1346.
- Takahashi P, Xavier DJ, Evangelista AF et al. (2014) MicroRNA expression profiling and functional annotation analysis of their targets in patients with type 1 diabetes mellitus. *Gene* 539:213-223.
- Takamura T, Honda M, Sakai Y et al. (2007) Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells reflect the pathophysiology of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 361:379-384.
- Taylor SI (1999) Deconstructing type 2 diabetes. *Cell* 97:9-12.
- Tonooka N, Oseid E, Zhou H et al. (2007) Glutathione peroxidase protein expression and activity in human islets isolated for transplantation. *Clin Transplant* 21:767-772.

van Oostrom O, de Kleijn DP, Fledderus JO et al. (2009) Folic acid supplementation normalizes the endothelial progenitor cell transcriptome of patients with type 1 diabetes: a case-control pilot study. *Cardiovasc Diabetol* 8:47.

von Herrath M (2009) Can we learn from viruses how to prevent type 1 diabetes?: the role of viral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes and the development of novel combination therapies. *Diabetes* 58:2-11.

Wållberg M, Cooke A (2013) Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends Immunol* 34:583-591.

Wang Y, Vera L, Fischer WH, Montminy M (2009) The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. *Nature* 460:534-537.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75:855-862.

Yang J, Robert CE, Burkhardt BR et al. (2005) Mechanisms of glucose-induced secretion of pancreatic-derived factor (PANDER or FAM3B) in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 54:3217-3228.

Zacccone P, Cooke A (2011) Infectious triggers protect from autoimmunity. *Semin Immunol* 23:122-129.

Zipitis CS, Akobeng AK (2008) Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child* 93:512-517.