Daniele Pereira dos Santos Bezerra

**Identificação de fatores epigenéticos
associados às complicações crônicas em
portadores de diabetes mellitus tipo 1**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Cardillo
Côrrea Giannella

São Paulo

2018

Daniele Pereira dos Santos Bezerra

**Identificação de fatores epigenéticos
associados às complicações crônicas em
portadores de diabetes mellitus tipo 1**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Cardillo
Côrrea Giannella

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bezerra, Daniele Pereira dos Santos
Identificação de fatores epigenéticos associados
às complicações crônicas em portadores de diabetes
mellitus tipo 1 / Daniele Pereira dos Santos
Bezerra. -- São Paulo, 2018.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Lucia Cardillo Côrrea
Giannella.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 1
2.Nefropatias diabéticas 3.Neuropatias diabéticas
4.Retinopatia diabética 5.Repressão epigenética
6.Polimorfismo de nucleotídeo único 7.Sirtuína 1
8.DNA (citosina-5-) metiltransferase 9.MicroRNAs

USP/FM/DBD-105/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Dedico esta tese primeiramente a Deus.

*Aos meus pais, Ivani e Miguel, e ao meu irmão
Gabriel pelo apoio, amor e dedicação incondicionais.*

*E ao grande amor da minha vida e meu porto seguro
Marcelo Bezerra.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella, que durante esses anos conseguiu fazer eu me enxergar como uma pesquisadora e acreditar no meu potencial. Agradeço também a amizade que construímos e nutrimos durante esses anos com muitos abraços, olhares, cafés e doces! Parabéns por ser essa pessoa incrível e admirada por todos ao seu redor. Todos os Malunos com certeza concordam comigo de que você é uma orientadora sensacional.

À Tatiana Pelais, que se tornou uma grande companheira do dia a dia. Juntas tivemos dias de experimentos difíceis e desânimo, mas muitos mais dias de bolos, croassinhos, café e risadas. Tati, muito obrigada pela estabilidade emocional no laboratório!

À minha amiga Sharon Admoni, que me acompanhou durante todo o doutorado com a sua bondade e alegria. Shá, você contagia a todos ao seu redor, obrigada por sempre estar por perto e me fazer rir com tantos vídeos felizes!

Às minhas queridas amigas Pós-Docs, Beatriz Monteiro e Karina Thieme, que mesmo em países diferentes compartilharam o conhecimento e bons momentos comigo. Obrigada por me “adotarem” e sempre estarem dispostas a me ajudar!

Ao Thiago Patente, que sempre me ensinou estatística e esteve disposto a me socorrer nas análises mais difíceis. Muito Obrigada por tudo Thi!

A todos os Malunos que conquistaram meu coração; tenho orgulho de fazer parte desse time tão unido e empenhado do Diabetes.

O grupo das complicações, como o Ricardo Perez nos apelidou, fez com que surgissem amizades sinceras com muito aprendizado. Obrigada Perez, Gustavo Daher, Marcos

Tadashi, Gabriel Guimarães, Juliana Zucare, Tatiana Pelaes, Sharon Admoni, Karina Thieme, Beatriz Monteiro e Thiago Patente!

A toda a equipe de funcionários do LIM-25 (Grupo de Diabetes), em especial à Maria Auxiliadora e a Ana Mercedes, que me ajudou imensamente desde o início e me deu importantes dicas técnicas que facilitaram o meu dia-dia de pesquisadora.

À Dra. Marisa Passarelli, que sempre esteve presente durante a execução de todo este trabalho de Doutorado, sempre dando contribuições valiosíssimas.

Aos funcionários e alunos do LIM-10, principalmente: Claudia Souza, Karol Santana e Paula Ramos.

À Paula Ramos, que foi uma grande companheira em tantos créditos cumpridos ao longo do Doutorado! Obrigada por tantas conversas, gargalhadas e cervejas!

À Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva, que fez muitas contribuições para o meu doutorado e possibilitou a realização de toda a parte de micro RNAs. Muito obrigada Dra. Beth por ter contribuído de forma essencial para realização dessa tese.

À Tânia Santos, que me ajudou em toda realização do perfil dos miRNAs e compartilhou comigo seu conhecimento. Obrigada Tânia por sempre estar ao meu lado e contribuir de forma tão significativa para a realização desta tese.

À Dra. Sandra Mara Ferreira Villares, pelas sugestões e contribuições no exame de qualificação.

À Prof. Dra. Suely Marie, que foi de enorme contribuição no exame de qualificação e que muito me ensinou nas análises *in silico*.

Ao Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado, pela inclusão deste trabalho de Doutorado no seu Projeto Temático, por ser sincero e crítico nas análises dos resultados, fazendo com que eu fosse rigorosa e exigente na realização da minha metodologia. Obrigada por contribuir no meu crescimento como pesquisadora!

À Rosana Mori, obrigada por ter me ajudado nas genotipagens dos SNPs e por dividir tardes deliciosas ao meu lado e da Tati!

À Dra. Marcia Nery e à Dra. Marcia Queiroz, que sempre incentivam os Malunos a trabalharem arduamente e a fazerem pesquisa!

À Dra. Maria Adelaide, que com seu bom humor nos alegrou com boas risadas!

A todos os funcionários, enfermeiras e auxiliares de enfermagem que contribuíram para a coleta de amostras.

Aos Residentes e Preceptores da Disciplina de Endocrinologia, que incentivaram os pacientes a participar da pesquisa.

À Maria Aparecida, secretária do Programa de Pós-graduação da Endocrinologia, que com toda dedicação e carinho nos ajuda com toda burocracia!

Aos pacientes e aos controles saudáveis que doaram material para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas da época da graduação na UNESP-Botucatu e também às amigas de república, que mesmo distantes fisicamente se fizeram presentes em momentos de conversa, carinho e descontração, sempre me incentivando a seguir em frente, minhas lindas: Vânia Magalhães, Bruna Lara, Bianca Tofoli, Fabiana Zambuzi e Victória Faleiros.

Aos meus queridos amigos de vida que durante essa etapa me acompanharam e apoiaram: Maíra Sabóia, Denise Ribeiro, Paola Souza, Patrícia Sipriano, Camila Bezerra, Danilo Reis, Vinícia Grams, Kelly Furtado, Marco Ayo e Thaís Vendramini! A amizade de vocês faz com que eu sempre pense em motivos para comemorar para brindarmos juntos!

A toda minha grande família que acredita no meu potencial e que sempre me incentivou a me tornar uma Doutora, saibam que vocês são a base de toda a minha força, alegria e amor. Obrigada principalmente: Miguel Santos (pai), Ivani Santos (mãe), Iranda Alves (sogra), Wilson Bezerra (sogro), Camila Alves (cunhada), Elanio Bezerra (cunhado), Gabriel Santos (irmão) e Marcelo Bezerra (marido).

Ao meu irmão Gabriel Santos, que sempre me perguntou sobre a tese e escutou eu explicar, mesmo sem entender nada! Gáh, obrigada por efetivamente estar ao meu lado e se preocupar comigo e meus questionamentos! Sempre estaremos juntos meu amado irmão!

Aos meus amados pais, Miguel e Ivani, a minha maior gratidão e amor é para vocês que sempre me incentivaram a estudar e me deram todo apoio necessário para que eu pudesse me dedicar exclusivamente à obtenção do conhecimento. Vocês são os pais mais incríveis do mundo e eu os amo incondicionalmente. Estou muito feliz de realizar um sonho que sempre foi nosso, o de me tornar uma Doutora!

Ao Marcelo Bezerra, meu marido, por me transbordar de amor e dedicação. Por acreditar que sou capaz e que tudo sempre dará certo no final! Amor, obrigada por trazer sua tranquilidade que acalma o borbulhão de ansiedade do meu coração. Te amo infinito!

À FAPESP pelo financiamento do projeto e ao CNPq pela bolsa de estudo.

*“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o
dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.”*

Dalai Lama

Esta tese esta de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicacao:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de Sao Paulo. Faculdade de Medicina. Servico de Biblioteca e Documentacao. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragao, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3a ed. Sao Paulo: Servico de Biblioteca e Documentacao; 2011.

Abreviaturas dos titulos dos periodicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	30
1.1 Modificações na cromatina	35
a. Modificações pós-traducionais das histonas.....	36
b. Metilação do DNA	39
1.2 Micro-RNAs.....	43
2. OBJETIVOS.....	52
3. JUSTIFICATIVA.....	54
4. METODOLOGIA	56
4.1 Seleção de Pacientes	57
4.2 Avaliação laboratorial e de variáveis clínicas	59
4.3 Avaliação do perfil de miRNAs associados ao DM	64
4.4 Validação dos miRNAs.....	67
4.5 Estudo de polimorfismos em genes relacionados à epigenética	69
4.6 Análise Estatística.....	71
5. RESULTADOS.....	74
6.1 Perfil de miRNAs sérico	75
6.2 Validação dos miRNAs.....	79
6.3 Estudo de associação de polimorfismos com as complicações microvasculares	80
6. DISCUSSÃO.....	91
6.1. Perfil miRNAs.....	92

6.2.	Polimorfismos	96
8	CONCLUSÃO	98
9	ANEXOS	99
10	REFERÊNCIAS	99

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura de um mononucleossomo. O DNA é a fita em cinza que envolve o octâmero de histonas, composto por duas unidades de cada histona: H2A (laranja), H2B (vermelha), H3 (azul) e H4 (verde)	35
Figura 2. Acetilação e deacetilação da cromatina.	36
Figura 3. Metilação na posição 5 de resíduos de citosina localizados na região promotora do gene (Ilhas CpGs) catalizada pela DNA metil transferase (DNMT).	39
Figura 4. A. Metilação e desmetilação de citosinas na região promotora dos genes permite ou não a ligação de fatores de transcrição, modulando, assim, a transcrição gênica. B. A cromatina metilada fica condensada, impedindo sua transcrição.....	40
Figura 5. DNMT1 é responsável pela manutenção da metilação gênica, enquanto a DNMT3A e a DNMT3B contribuem para metilações “de novo” no genoma.	41
Figura 6. Organização genômica dos miRNAs	44
Figura 7. Biogênese do micro RNA (miRNA) maduro.....	46
Figura 8. Placa <i>Taqman Low Density Arrays</i> (TLDA) após o processo de centrifugação e recorte das canaletas para prosseguir com a quantificação do cDNA.	66
Figura 9. Preparação do micro-RNA para a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	69
Figura 10. Volcano <i>plot</i> da expressão dos micro-RNAs entre os dois grupos de pacientes estudados. O grupo sem complicações foi usado como referência; cada ponto	

vermelho representa um micro-RNA mais expresso no grupo com complicações, considerando um $P < 0,05$ 75

Figura 11. Expressão normalizada dos micro-RNAs diferencialmente expressos entre os grupos sem e com complicações microvasculares. $P < 0,05$ foi considerado significativo (teste de Wilcoxon). Estão demonstrados os dados relativos aos hsa-miRs: 518d-3p, 34a-3p, 126-5p, 425-5p e 618 (a, b, c, d e e, respectivamente). 77

Figura 12. Diagrama de Veen representando a quantidade de genes-alvo comuns entre os cinco micro-RNAs séricos (com menores valores de P) diferencialmente expressos entre os grupos com e sem complicações. Esses genes-alvo foram comprovados por estudos funcionais. 78

Figura 13. Expressão normalizada dos micro-RNAs validados entre os grupos sem e com complicações microvasculares. $P < 0,05$ foi considerado significativo (teste de Wilcoxon). Estão demonstrados os hsa-miRs: 518d-3p, 34a-3p, 126-5p, 425-5p e 618 (a, b, c, d e e, respectivamente). 80

Figura 14. Desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados no gene *DNMT1*, determinado por D' (a.) e por R^2 (b.). 81

Lista de Tabelas

Tabela 1. Alvos moleculares e efeitos da atuação da sirtuína 1.	38
Tabela 2. Características clínicas e laboratoriais dos portadores de DM1 divididos em dois grupos, de acordo com a presença das complicações crônicas.....	58
Tabela 3. Características clínicas e laboratoriais dos portadores de DM1 divididos em dois grupos, de acordo com a presença das complicações crônicas para a validação dos micro-RNAs	68
Tabela 4. Lista dos micro-RNAs diferencialmente expressos entre pacientes com e sem complicações crônicas microvasculares	76
Tabela 5. Polimorfismos nos genes <i>SIRT1</i> e <i>DNMT1</i> caracterizados quanto ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.	81
Tabela 6. Características dos pacientes sem e com Neuropatia Periférica (NP)	82
Tabela 7. Frequência dos genótipos de acordo com o <i>status</i> da neuropatia periférica (NP)	83
Tabela 8. Características dos pacientes com e sem neuropatia autonômica cardiovascular (NAC).....	84
Tabela 9. Frequência dos genótipos de acordo com o <i>status</i> da neuropatia autonômica cardiovascular (NAC).....	85
Tabela 10. Frequência dos genótipos do rs11085721 no gene <i>DNMT1</i> de acordo com o <i>status</i> da neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) no sexo feminino	86

Tabela 11. Características dos pacientes com e sem retinopatia diabética (RD)..... 87

Tabela 12. Frequência dos genótipos de acordo com o *status* da retinopatia diabética (RD)..... 88

Tabela 13. Características dos pacientes com e sem doença renal diabética (DRD) 89

Tabela 14. Frequência dos genótipos de acordo com o *status* da doença renal diabética (DRD) 90

Lista de Abreviaturas

ACR	Razão albumina/creatinina urinária
AGE	Produtos finais de glicação avançada (do inglês: <i>advanced glycation end products</i>)
AGO2	Argonauta 2
AKT	Proteína cinase B
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína-1 de ativação (do inglês: <i>Activator protein 1</i>)
cDNA	DNA complementar
CH ₃	Grupamento metil
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX	Ciclo-oxigenase
Ct	do inglês: <i>cycle threshold</i>
DAC	Doença arterial coronariana
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
DCV	Doença cardiovascular
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region in gene 8</i>
DM	Diabetes mellitus

DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMTs	DNA metiltransferases
dNTPs	Desoxinucleosídeos trifosfato
DRCT	Doença renal crônica terminal
DRD	Doença renal diabética
dUTPs	Desoxiuridina trifosfato
EDIC	<i>Epidemiology of Diabetic Complications and Interventions Trial</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EURODIAB	<i>European Diabetes Prospective Complications Study Group</i>
EWB	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
FOXO	Proteína do “ <i>forkhead box</i> ” O1
GLUT	Transportador de glicose
H	Histona
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica

HATs	Histonas acetiltransferases
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDACs	Histonas desacetilases
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês: <i>high-density lipoprotein</i>)
HF	Alta frequência (do inglês: <i>high frequency</i>)
HO	Hipotensão ortostática
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (do inglês: <i>high-performance liquid chromatography</i>)
hsa	<i>Homo sapiens</i>
IC	Intervalo de confiança
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
IRC	Insuficiência renal crônica
IRMAs	Anormalidades microvasculares intrarretinianas
IRS	Substrato do receptor de insulina (do inglês: <i>insulin receptor substrate</i>)
K	Lisina

KO	<i>Knockout</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês: <i>low-density lipoprotein</i>)
LF	Baixa frequência (do inglês: <i>low frequency</i>)
MAF	Frequência do alelo raro (do inglês: <i>minor allele frequency</i>)
miR	Micro-RNA maduro
miRNA	Micro-RNA
mRNA	RNA mensageiro
NAC	Neuropatia autonômica cardiovascular
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina difosfato (do inglês: <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NFkB	Fator nuclear kB (do inglês: <i>factor nuclear kappa B</i>)
NP	Neuropatia periférica
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
PACT	<i>Protein activator of the interferon-induced protein kinase</i>
PARP1	Poli (ADP-ribose) polimerase-1 (do inglês: <i>poly [ADP-ribose] polymerase I</i>)

PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês: <i>polymerase chain reaction</i>)
PGC1 α	Coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (do inglês: <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>)
PI	Fosfatidilinositol
PIK3R2	<i>Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 2</i>
PKC	Proteína cinase C
PNUTS	Proteína alvo da subunidade fosfatase 1 nuclear (do inglês: <i>protein phosphatase 1 nuclear-targeting subunit</i>)
PPAR α	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma alfa (do inglês: <i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>)
PRKRA	<i>Interferon-inducible doublestranded RNA-dependent activator</i>
PTPRD	Receptor tirosina fostato do tipo delta (do inglês: <i>protein tyrosine phosphatase receptor type delta</i>)
R	Arginina
RCF	Força centrífuga relativa (do inglês: <i>relative centrifugal force</i>)
RD	Retinopatia diabética
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA (do inglês: <i>RNA-induced silencing complex</i>)

RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa (do inglês: <i>reverse transcription</i>)
S	Serina
SAH	S-adenosil-L-homocisteína
SAM	S-adenosil-L-methionina
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SDF-1	Fator-1 derivado das células do estroma (do inglês: <i>stromal cell derived factor 1</i>)
SIRT	Sirtuína
SNPs	Polimorfismos de um único nucleotídeo (do inglês: <i>single nucleotide polymorphisms</i>)
SPRED	<i>Sprouty-related protein with an EVH1 domain</i>
T	Treonina
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimada
TG	Triglicérides
TGFβ	Fator de crescimento transformante beta (do inglês: <i>transforming growth</i>

factor beta)

TLDA	do inglês: <i>Taqman Low Density Arrays</i>
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês: <i>tumor necrosis factor</i>)
TNRC6	<i>Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein</i>
TRBP	<i>Trans-activation response RNA-binding protein</i>
TXNIP	Proteína de interação com a tiorredoxina (do inglês: <i>thioredoxin interacting protein</i>)
UTR	do inglês: <i>untranslated region</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês: <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VFC	Variabilidade de frequência cardíaca
VLF	Frequência muito baixa (do inglês: <i>very low frequency</i>)
XTO-5	Exportina 5

Resumo

Bezerra DPS. *Identificação de fatores epigenéticos associados às complicações crônicas em portadores de diabetes mellitus tipo 1* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: Fatores associados à etiopatogenia das complicações diabéticas, incluindo hiperglicemia e estresse oxidativo, podem causar alterações epigenéticas que modificam a expressão de genes em células-alvo, sem alterar sua sequência de DNA. São considerados mecanismos epigenéticos: (1) as modificações pós-traducionais das histonas; (2) a metilação do DNA e (3) a ação dos micro-RNAs (miRNAs); todos já foram reconhecidos na patogênese da “memória metabólica”, situação na qual a hiperglicemia continua a exercer efeitos deletérios prolongados mesmo depois de ser normalizada. A sirtuína-1 é uma enzima que causa modificações pós-traducionais das histonas por sua atividade de histona desacetilase, silenciando a transcrição gênica. O silenciamento gênico também pode ocorrer pela ação da DNA metiltransferase 1 (DNMT1), enzima que adiciona um grupamento metil (CH₃) na posição 5 de resíduos de citosina localizadas em ilhas CpG presentes nas regiões promotoras dos genes. Os miRNAs constituem uma classe de pequenos RNAs não codificadores com cerca de 19 a 25 nucleotídeos que controlam a expressão gênica por meio da repressão da tradução ou da degradação do RNA mensageiro-alvo. As hipóteses do presente estudo são (1) que exista um perfil sérico de miRNAs associado à presença ou ausência de complicações crônicas e (2) que existam variantes em genes relacionados à desacetilação das histonas e à metilação de citosinas que poderiam predispor ao aparecimento das complicações diabéticas, o que se constituiria na “genética da epigenética”. **OBJETIVOS:** (1) caracterizar e comparar o perfil de miRNAs sérico de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (DM1) sem nenhuma complicação microvascular *versus* aqueles com três complicações microvasculares: retinopatia diabética (RD), doença renal diabética (DRD) e neuropatia diabética, para identificar vias epigeneticamente moduladas nesses dois grupos de pacientes e (2) avaliar a frequência de polimorfismos de um único nucleotídeo nos genes que codificam as enzimas DNMT1 e sirtuína-1 e suas associações com cada uma das complicações microvasculares em pacientes com DM1. **MÉTODOS:** O perfil sérico de 381 miRNAs foi avaliado com o uso do estojo comercial *Taqman® Human MicroRNA Array A* em 10 pacientes bem caracterizados clínica e laboratorialmente divididos em dois grupos: Pacientes com DM1 sem complicações [sem DRD (*Clearance* de creatinina > 90 ml/min/1,73 m² e excreção urinária de albumina < 20 mg/g de creatinina), sem polineuropatia sensitivo-motora distal (ausência de sintomas sugestivos de neuropatia, sensibilidade térmica e dolorosa e reflexo aquileu normais), sem neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) e sem RD] e Pacientes com DM1 com complicações [DRD (*Clearance* de creatinina < 60 ml/min/1,73 m² e excreção urinária de albumina > 200 mg/g de creatinina), com polineuropatia sensitiva-motora distal, com NAC instalada e RD moderada ou grave]. Os cinco miRNAs mais diferencialmente expressos foram

validados em uma casuística bem caracterizada de 20 pacientes com DM1 sem nenhuma complicação e 27 com todas as complicações microvasculares, com o emprego do estojo comercial *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis*. A avaliação da frequência de polimorfismos de um único nucleotídeo nos genes que codificam as enzimas DNMT1 (rs8112895, rs7254567, rs11085721, rs17291414, rs10854076) e sirtuína-1 (rs10997870; rs12766485) foi realizada após a genotipagem por reação em cadeia da polimerase em tempo real, em uma casuística composta por 466 pacientes com DM1. RESULTADOS: Do total de 377 miRNAs-alvo avaliados no soro dos pacientes com DM1, um total de 21 miRNAs estava superexpresso no grupo com complicações. Dos 5 miRNAs para os quais foi realizada a validação na casuística de 47 pacientes com DM1, dois foram confirmados como superexpressos na população com complicações (hsa-miR-518d-3p e hsa-miR-618). O polimorfismo rs11085721 no gene que codifica a DNMT1 associou-se à presença de NAC no sexo feminino, sendo o alelo raro C considerado de risco e conferindo um *odds ratio* (intervalo de confiança de 95%) de 2,44 (1,26-5,28). Nenhum polimorfismo da sirtuína-1 associou-se às complicações microvasculares avaliadas. CONCLUSÃO: o perfil de miRNAs séricos difere entre pacientes com DM1 com e sem complicações. O achado de uma variante em um gene que codifica a enzima de uma via epigenética conferir suscetibilidade a uma complicação crônica sugere que também exista a “genética da epigenética” modulando o desenvolvimento das complicações.

Descritores: diabetes mellitus tipo 1; nefropatias diabéticas; neuropatias diabéticas; retinopatia diabética; repressão epigenética; polimorfismo de nucleotídeo único; sirtuína 1; DNA (Citosina-5-) metiltransferase; microRNAs

Abstract

Bezerra DPS. *Identification of epigenetic factors associated with chronic complications in patients with type 1 diabetes mellitus* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

INTRODUCTION: Factors associated with the etiopathogenesis of diabetic complications, including hyperglycemia and oxidative stress, may cause epigenetic changes that modify the expression of genes in target cells without altering their DNA sequence. The following mechanisms are considered epigenetics: (1) post-translational modifications of histones; (2) methylation of DNA and (3) action of micro-RNAs (miRNAs); all have already been recognized in the pathogenesis of "metabolic memory", a situation in which hyperglycemia exerts prolonged deleterious effects even after its normalization. Sirtuin-1 is an enzyme that causes post-translational modifications of histones by their histone deacetylase activity, silencing gene transcription. Gene silencing may also occur through the action of DNA methyltransferase 1 (DNMT1), an enzyme that adds a methyl group (CH₃) at position 5 of cytosine residues located in CpG islands from gene-promoter regions. miRNAs are a class of small non-coding RNAs with about 19 to 25 nucleotides that control gene expression by promoting translation repression or degradation of target messenger RNAs. The hypotheses of the present study are (1) there is a serum profile of miRNAs associated with the presence or absence of chronic complications and (2) there are variants in genes related to histone deacetylation and cytosine methylation that could predispose to diabetes complications, which would constitute the "genetics of epigenetics". OBJECTIVES: (1) to characterize and compare the serum miRNA profile of patients with type 1 diabetes mellitus (T1D) without any microvascular complications versus those with three microvascular complications: diabetic retinopathy (DR), diabetic kidney disease (DKD) and diabetic neuropathy to identify signaling pathways epigenetically modulated in these two groups of patients and (2) to assess the frequency of single nucleotide polymorphisms in the genes encoding DNMT1 and sirtuin-1 and their associations with each of the microvascular complications in T1D patients. METHODS: The serum profile of 381 miRNAs was evaluated using the Taqman® Human MicroRNA Array A kit in 10 clinical and laboratory well-characterized patients divided into two groups: Patients without microvascular complications: without DKD (creatinine clearance > 90 ml/min/1.73 m² and urinary

albumin excretion <20 mg / g creatinine), without distal sensory-motor polyneuropathy (absence of symptoms suggestive of neuropathy and normal thermal and pain sensitivity and Achilles reflex), without cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) and without DR; and T1D patients with complications: with DKD (creatinine clearance <60 ml / min / 1.73 m² and urinary albumin excretion > 200 mg / g creatinine), with distal sensory-motor polyneuropathy, with CAN and with DR moderate or severe. The five most differentially expressed miRNAs were validated in a well-characterized case series of 20 patients with no complications and 27 patients with all microvascular complications using the TaqMan ™ Advanced miRNA cDNA Synthesis kit. The evaluation of the frequency of single nucleotide polymorphisms in genes encoding the DNMT1 (rs8112895, rs7254567, rs11085721, rs1729414, rs10854076) and sirtuin-1 (rs10997870; rs12766485) was performed by genotyping using real-time polymerase chain reaction in a sample of 466 T1D patients. RESULTS: Of the total of 377 target miRNAs evaluated in the serum of T1D patients, 21 miRNAs were overexpressed in the group with complications. Of the 5 miRNAs for which validation was performed in 47 patients, two were confirmed as overexpressed in the group with complications (hsa-miR-518d-3p and hsa-miR-618). The polymorphism rs11085721 in the gene encoding DNMT1 was associated with the presence of CAN in female patients, with the minor allele C being considered of risk and conferring an odds ratio (95% confidence interval) of 2.44 (1.26 – 5.28). Polymorphisms in the gene encoding Sirtuin-1 did not associate with microvascular complications. CONCLUSION: the serum miRNA profile differs between patients with and without microvascular complications. A variant in a gene encoding a enzyme of an epigenetic pathway conferring susceptibility to a chronic complication suggests that there is also the "genetics of epigenetics" modulating the development of complications.

Descriptors: diabetes mellitus, type 1; diabetic nephropathies; diabetic neuropathies; diabetic retinopathy; epigenetic repression; polymorphism, single nucleotide; sirtuin 1; DNA (cytosine-5-)-methyltransferase; microRNAs

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida para homens e mulheres com Diabetes mellitus (DM) tipo 1 está aumentando, e conseqüentemente, aumentam os anos vividos com incapacidades secundárias às suas complicações crônicas (1). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que no ano de 2012, o DM tenha determinado 1,5 milhões de mortes, o que corresponde a 2,7% de todas as mortes (2). De acordo com a OMS, existiam em 2014 cerca de 422 milhões de pessoas no mundo portadoras de DM, sendo que em 2030 ele afetará aproximadamente 642 milhões de pessoas e será considerado a sétima causa de morte no mundo (3).

O controle glicêmico inadequado e o maior tempo de DM são os determinantes mais importantes das complicações microvasculares no DM tipo 1 (DM1): acometimento da microvasculatura da retina (retinopatia), do glomérulo e dos túbulos renal (doença renal diabética) e dos nervos periféricos e autonômicos (neuropatia); o DM também está associado à doença macrovascular aterosclerótica acelerada que afeta as coronárias e as artérias que suprem o cérebro e os membros inferiores (macroangiopatia) (4).

A retinopatia diabética (RD) é a complicação microvascular com maior prevalência entre os indivíduos com DM1, sendo a maior causa de amaurose nesses pacientes (5, 6). As principais alterações encontradas na retina acometida por essa complicação são a quebra na barreira hemato-retiniana, a perda dos pericitos capilares, a presença de microaneurismas, disfunção neuronal e isquemia progressiva (7). A RD pode causar a perda irreversível da visão por hemorragias no humor vítreo ou por descolamento da retina secundária à fibrose e conseqüente retração (8).

Clinicamente, a RD é dividida em não proliferativa e proliferativa. A RD não proliferativa é caracterizada por um amplo espectro de lesões na retina: mudanças na permeabilidade vascular, microaneurismas capilares, degeneração capilar e hemorragias. Já a RD proliferativa além dos sinais anteriores, apresenta a formação de neovasos (9). Estima-se que de 23 a 59% dos indivíduos com DM1 sejam acometidos com a forma moderada ou grave desta complicação microvascular (1).

A doença renal diabética (DRD) afeta aproximadamente 40% dos pacientes com DM1 e está entre as principais causas de doença renal crônica terminal (DRCT). Nas fases iniciais da DRD existem anormalidades hemodinâmicas que resultam em hiperfiltração glomerular e, muitas vezes, em microalbuminúria. A função glomerular tende a declinar e, na maioria dos casos, ocorre piora da magnitude da albuminúria. Em uma parcela dos pacientes, a diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) pode progredir até a perda total da função renal (8). Segundo dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia, a DRD juntamente com a hipertensão arterial são responsáveis por aproximadamente metade dos pacientes em tratamento dialítico (10).

A neuropatia diabética é definida como a presença de sinais e sintomas de disfunção dos nervos periféricos em pacientes com DM, desde que sejam excluídas outras causas de neuropatia (11). Aproximadamente 50% dos portadores de DM são acometidos por algum grau de neuropatia diabética (8). A neuropatia também pode atingir o sistema nervoso autônomo de diferentes sistemas. Apesar do seu impacto importante sobre a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes com DM, a neuropatia autonômica no sistema cardiovascular está entre as neuropatias menos diagnosticadas e estudadas.

A neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) é um preditor independente de mortalidade por doença cardiovascular (DCV) e de progressão da DRD. A prevalência

da NAC varia de 17% a 90% em pacientes com DM1, conforme relatado em estudos recentes. O principal fator de risco para progressão da NAC é o mau controle glicêmico; no *Diabetes Control and Complication Trial* (DCCT), o controle glicêmico intensivo resultou em uma redução de 50% na incidência de NAC ao longo dos 6,5 anos de seguimento (12). Aqueles pacientes acometidos sofrem primeiramente a perda do sistema parassimpático e em estágios mais graves, ocorre falência do sistema nervoso autonômico simpático (13).

A hiperglicemia é o principal fator etiopatogênico para o desenvolvimento das complicações do DM, e as diferentes vias metabólicas desencadeadas pela hiperglicemia têm como elo o estresse oxidativo celular. A maior metabolização da glicose e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) favorecem a produção de oxoaldeídos reativos, como metilglioxal, glioxal, 3-deoxiglicosona e glicolaldeído. Esses compostos promovem a modificação rápida e irreversível de diferentes macromoléculas por glicação avançada, o que altera a estrutura e função biológica das mesmas (14).

Os produtos de glicação avançada (AGEs) são compostos heterogêneos e, em sua maioria, caracterizam-se por reações conjuntas de oxidação (glicoxidação) e pela emissão de fluorescência, o que facilita sua detecção; sua determinação no plasma, pele e tecidos prediz o desenvolvimento de RD e de DRD, independentemente da HbA1c (15, 16).

A participação da hiperglicemia no aparecimento das complicações crônicas está bem estabelecida. A duração do DM, a idade ao diagnóstico, bem como outras comorbidades, como dislipidemia e hipertensão arterial, também influenciam o desenvolvimento e a progressão das complicações. No entanto, sabe-se que o aparecimento das complicações crônicas também é determinado por uma

susceptibilidade genética à lesão induzida pelas alterações metabólicas causadas pela hiperglicemia crônica (17). Na prática clínica, observam-se pacientes com grau de controle metabólico e duração do DM semelhantes, mas que apresentam diferenças na suscetibilidade para as complicações, razão pela qual é importante a identificação de genes de susceptibilidade a DRD (18-20) e às demais complicações.

Recentemente, alterações epigenéticas têm sido identificadas como participantes da patogênese das complicações diabéticas; vários estudos já mostraram que períodos de hiperglicemia causam anormalidades permanentes (incluindo expressão gênica aberrante) nos tecidos-alvo das complicações, fenômeno denominado “memória metabólica”. Essa característica de manutenção da tendência ao desenvolvimento das complicações na ausência de hiperglicemia pode ser explicada não apenas pela formação dos AGEs, que têm meia-vida longa, como também pelos mecanismos epigenéticos, quais sejam: modificações pós-traducionais nas histonas, metilação da citosina do DNA e controle da expressão gênica por micro-RNAs não codificantes. Esses mecanismos permitem que as células respondam de maneira rápida às mudanças ambientais, ao mesmo tempo em que “memorizam” essas respostas mesmo após a remoção do estímulo que as causou (21).

O DCCT e a sua continuação, o *Epidemiology of Diabetic Complications and Interventions Trial* (EDIC) evidenciaram os efeitos da “memória metabólica” em pacientes com DM1. Aqueles que estavam inicialmente alocados no grupo que recebeu tratamento convencional (controle glicêmico subótimo) tiveram mais complicações microvasculares e eventos cardiovasculares quando comparados aos pacientes alocados no grupo que recebeu tratamento intensivo (bom controle glicêmico), mesmo depois de um longo período de controle metabólico semelhante durante os anos do estudo EDIC (22-24).

As modificações pós-traducionais das histonas, a metilação da citosina e a ação dos micro-RNAs estão envolvidos na “memória metabólica” e explicam os efeitos deletérios duradouros da hiperglicemia mesmo após melhora do controle glicêmico (25).

1.1 Modificações na cromatina

A cromatina é composta de subunidades conhecidas por nucleossomos, que contém o DNA, com aproximadamente 145 pares de base, envolto por um octâmero de histonas, com duas unidades de cada histona: H2A, H2B, H3 e H4 (Figura 1). O empacotamento adicional é alcançado por meio da histona H1, que liga o DNA aos nucleossomos vizinhos (26).

Figura 1. Estrutura de um mononucleossomo. O DNA é a fita em cinza que envolve o octâmero de histonas, composto por duas unidades de cada histona: H2A (laranja), H2B (vermelha), H3 (azul) e H4 (verde). Adaptado de Muller MM, 2015 (26).

O processo de ativação e repressão transcricional é dinâmico e depende do recrutamento de complexos proteicos que alteram a estrutura da cromatina por modificarem enzimaticamente as caudas das histonas, alterando a remodelagem do nucleossomo, ou por modificarem o DNA (27).

a. Modificações pós-traducionais das histonas

Modificações como: acetilação, metilação e ubiquinação do aminoácido lisina (K); fosforilação dos aminoácidos serina (S) e treonina (T) e metilação do aminoácido arginina (R) promovem mudanças na interação das histonas com o DNA.

A acetilação dos resíduos de K está entre as modificações mais estudadas e dentre as enzimas envolvidas neste processo estão as histonas acetiltransferases (HATs) e as histonas desacetilases (HDACs). As HATs promovem a acetilação da porção aminoterminal das lisinas H3 e H4, permitindo a formação de eucromatina; já as HDACs desacetilam as histonas nas mesmas porções, levando à formação de heterocromatina e silenciando a transcrição gênica (28) (Figura 2).

Figura 2. Acetilação e deacetilação da cromatina. Adaptado de Eberharte A. e cols, 2002 (29).

Em cultura de monócitos humanos (linhagem THP-1) mantidos em altas concentrações de glicose, observou-se um aumento na atividade das HATs acetilando a cromatina na região promotora do gene que codifica o fator nuclear kappa B (NFκB)-p65, aumentando sua síntese, além de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias como: interleucina (IL) 6 e fator de necrose tumoral (TNF) (30).

Miao e cols. encontraram uma correlação entre os valores de HbA1c e o grau de acetilação das histonas em monócitos de participantes dos dois grupos avaliados no estudo DCCT. A hiperglicemia crônica promoveu, por meio da acetilação das histonas, um aumento da expressão de genes pró-inflamatórios e de citocinas que favorecem o aparecimento das complicações diabéticas (31).

Em modelos de ratos com DM tipo 2 (DM2), observou-se que no tecido renal, a acetilação da K na posição 9 da histona 3 (H3K9) culmina em glomeruloesclerose, resultando em DRD (32).

Uma das famílias mais conhecida de HDACs é a das sirtuínas, que dependem de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) para promoverem o silenciamento transcricional de genes que regulam o metabolismo lipídico e glicêmico, o ritmo circadiano, a biogênese mitocondrial e o controle das respostas à apoptose e ao estresse (33). A sirtuína 1 (SIRT1), um membro da família dos *silence information regulator*, é uma HDAC de classe III. A SIRT1 é responsável por regular a transcrição de genes, seja alterando o estado de acetilação do fator de transcrição ou regulando as modificações epigenéticas no local de ligação do fator transcricional em um gene-alvo, a fim de silenciá-lo (34).

A Tabela 1 demonstra as principais moléculas-alvo inibidas pela SIRT1, que é nuclear, e a repercussão desta atuação.

Tabela 1. Alvos moleculares e efeitos da atuação da sirtuína 1.

	Alvos moleculares	Efeitos
SIRT-1	Histona H3 e H4	
	P53	
	FOXO1/4	
	PGC1 α	Antiapoptótico
	NF κ B	Antienvelhecimento
	PARP-1	Anti-inflamatório
	TNF α	Heterocromatina: silenciamento de genes
	IL6	Melhoria da mitocôndriogênese
	COX2	Proteção contra o estresse oxidativo
	AP-1	
	IFN γ	
	IL-1 β	

Siglas: p53: supressor tumoral p53 cinase; FOXO: proteína do *Box forkhead* O1; PGC1 α : coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama; NF κ B: fator nuclear Kappa B; PARP1: poli (ADP-ribose) polimerase 1; TNF α : fator de necrose tumoral α ; IL6: interleucina 6; COX2: ciclo-oxigenase-2; AP-1: proteína-1 de ativação; IFN γ : interferon gamma; IL1 β : interleucina 1 β ; Adaptado de Keila L. M. e cols, 2017 (35)

Longos períodos de hiperglicemia podem ocasionar uma diminuição na expressão de sirtuína 1, resultando em resposta inflamatória que se segue à ativação da via do NF κ B e ao aumento da expressão do gene pró-apoptótico *Bax*, ambos ligados às complicações microvasculares diabéticas (36).

A presença conjunta de 11 polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene que codifica a sirtuína 1 foi relacionada a uma maior suscetibilidade a DRD em uma série japonesa de portadores de DM2; este estudo é o único na literatura que associa a presença de SNPs no gene *SIRT1* com o risco de complicações diabéticas (37).

Já a metilação das histonas tem a capacidade de promover tanto a formação de heterocromatina quanto de eucromatina, inativando ou ativando genes, respectivamente. A mono, di ou trimetilação em diferentes resíduos de K são catalisadas por histonas metil-transferases (HMTs) (38).

Estudos na literatura realizados com monócitos de portadores de DM1 e de DM2 mostraram que a hiperglicemia crônica é capaz de promover modificações, como a

dimetilação (me²) no resíduo de K da histona H3 na posição 9 (H3K9me²) e no resíduo K na posição 4 da histona H4 (H3K4me²), que modificaram a transcrição da IL1A e da IL8, respectivamente (39). O recrutamento do fator de transcrição NFκB na região promotora de enzimas antioxidantes secundariamente à modificações nas histonas também foi descrito na retina de roedores diabéticos mantidos com controle glicêmico inadequado por dois meses seguido por controle glicêmico adequado por dois meses adicionais (40).

b. Metilação do DNA

A metilação do DNA, como mecanismo epigenético, ocorre secundariamente à ação de enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (DNMTs), que adicionam o grupamento metil (CH₃) na posição 5 de resíduos de citosina localizadas em ilhas CpG presentes nas regiões promotoras dos genes, silenciado-os (41) (Figura 3).

Figura 3. Metilação na posição 5 de resíduos de citosina localizados na região promotora do gene (Ilhas CpGs) catalizada pela DNA metil transferase (DNMT). SAM: S-adenosil-L-metionina, SAH: S-adenosil-L-homocisteína. Adaptado de Rondelet G. e cols, 2017(42).

Na Figura 4 é possível observar que a metilação das citosinas localizadas em ilhas CpG presentes nas regiões promotoras dos genes impede a ligação de fatores de transcrição, silenciando-as (43).

Figura 4. A. Metilação e desmetilação de citosinas na região promotora dos genes permite ou não a ligação de fatores de transcrição, modulando, assim, a transcrição gênica. B. A cromatina metilada fica condensada, impedindo sua transcrição. Adaptado de Bansal A. e cols, 2017 (43).

Há quatro membros da família das DNMTs conhecidas como: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L; a DNMT3L, diferentemente das outras enzimas, não possui atividade enzimática inerente; a DNMT1 é responsável pela manutenção da metilação gênica, enquanto os membros DNMT3A e DNMT3B contribuem para metilações “*de novo*” no genoma (44) (Figura 5). As DNMTs desempenham papel fundamental na manutenção da integridade genômica, já que estudos experimentais

observaram que o *knockout* ou a inativação dessas enzimas levam a morte ainda no período embrionário (44).

Figura 5. DNMT1 é responsável pela manutenção da metilação gênica, enquanto a DNMT3A e a DNMT3B contribuem para metilações “de novo” no genoma. Adaptado de Bansal A e cols, 2017 (40).

Um estudo recentemente publicado demonstrou que o DM não modula a expressão do RNA mensageiro (mRNA) de *DNMT3A* e de *DNMT3B* na retina de roedores, enquanto aumenta a expressão de *DNMT1* por mecanismos ainda desconhecidos (45). Yang e cols. observaram que a glicose aumenta a expressão de *DNMT1* em cultura de células β -pancreáticas, entretanto este estudo não encontrou um aumento significativo na expressão dessa enzima em ilhotas pancreáticas de portadores de DM2 (46).

Na RD, a atividade da enzima DNMT está aumentada na retina e nas células capilares, às custas do aumento na expressão da *DNMT1*. Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstram que o aumento da expressão da *DNMT1* perdura mesmo depois

normalização das concentrações de glicose, sugerindo seu papel no fenômeno da memória metabólica (47).

Em modelos animais de DM2, observou-se que a maior expressão gênica de *DNMT1* em estágios mais avançados de DM promoveu uma maior metilação da região promotora do gene codificante do receptor tirosina fosfato do tipo delta (*PTPRD*), um receptor envolvido na sinalização da insulina, o que sugere que a progressão da doença esteja relacionada à hipermetilação do promotor do *PTPRD* pela *DNMT1* (48).

Em células humanas saudáveis, cerca de 1% de todas as citosinas do genoma estão metiladas, sendo que a metilação é tecido-específica e geneticamente determinada. A inativação de um dos cromossomos X na mulher, o *imprinting* genômico e aproximadamente 4% de todos os genes estão inativados pela metilação do DNA (49).

A hiperglicemia alterando o padrão de metilação do DNA foi demonstrada em modelos animais; Williams e cols. demonstraram hipometilação genômica no fígado de ratos diabéticos duas semanas após o início da hiperglicemia (modelo de DM1) (50) e, paradoxalmente, hipermetilação do DNA no fígado de ratos diabéticos Zucker de 12 semanas de idade (modelo de DM2) (51).

Maghboolian e cols., em um estudo com células linfomononucleares de portadores de DM2, mostraram diferença no padrão de metilação do DNA genômico entre pacientes com *versus* sem RD e ainda, que quanto mais grave a RD, mais metilado estava o DNA genômico (52). O mesmo grupo também observou que portadores de DM2 com DRD têm maior metilação do DNA que aqueles pacientes sem DRD e que a duração do DM e o controle glicêmico não se correlacionam com o grau de metilação em pacientes com albuminúria (53).

Um trabalho realizado com portadores de DM1 também correlacionou a metilação das ilhas CpG com DRD, sendo que foram encontradas 263 ilhas CpGs que,

quando metiladas, conferem risco a essa complicação microvascular e 162 ilhas que parecem exercer papel protetor. Em uma das ilhas que conferem risco para DRD, encontra-se o promotor do gene *UNC13B*, que mesmo metilado tem sua expressão maior em modelos de DRD e que leva à apoptose das células glomerulares (54).

Em 2011, um estudo realizado com saliva de portadores de DM1 e de DM2 com mais de 10 anos de doença mostrou que o padrão de metilação de 27.000 sítios CpG localizados em mais de 14.000 genes humanos é diferente, dependendo da progressão da DRD (55). Pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) em tratamento com hemodiálise também têm hipermetilação de algumas ilhas CpG e hipometilação de outras, possivelmente em decorrência da inflamação que esta condição determina; por exemplo, a metilação da região promotora do gene *MTHFR*, que é responsável por gerar grupamentos metil para todos processos celulares, inclusive a metilação do DNA, está diminuída nesses pacientes (55).

A metilação de ilhas CpG também pode estar associada a complicações macrovasculares do diabetes; Xu e cols., ao analisarem o grau de metilação das ilhas CpG do gene *GCK* (que codifica a glicocinase) em portadores de DM2, associaram a hipometilação deste gene ao maior risco de doença arterial coronariana (DAC) (56).

1.2 Micro-RNAs

O primeiro relato do que, no futuro, seria chamado de micro-RNA ocorreu em 1993, quando um RNA com aproximadamente 22 pares de base (pb) que não codificava uma proteína foi descrito, o lin-4, associado à regulação do desenvolvimento larval do nematoide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (57). Esse pequeno RNA com a sequência conservada em diferentes espécies de nematoides exercia um papel de

controlador pós-transcricional de um gene determinante do desenvolvimento desses animais, por meio da ligação à região 3' não traduzida de mRNAs (3'UTR) (57).

O termo micro-RNA (miRNA) começou a ser usado em 2001, quando foram descritos mais de cem novos genes de miRNAs considerados amplamente conservados entre as diferentes espécies (58, 59).

Atualmente, de acordo com o banco de miRNAs conhecido como miRbase, há 1.881 precursores de miRNA e 2.588 miRNA maduros conhecidos para a espécie humana (60). Os miRNAs podem ser organizados quanto à localização gênica podendo ser: (a) miRNAs intergênicos, (b) miRNAs intrônicos e (c) miRNAs exônicos ou intragênicos (61), ilustrados na Figura 6.

a. miRNAs intergênicos:

b. miRNAs intrônicos:

c. miRNAs exônicos:

Figura 6. Organização genômica dos miRNAs **a. miRNAs intergênicos:** sua expressão é regulada pelos promotores dos próprios genes e possuem características semelhantes às unidades transcricionais de genes codificadores de proteínas; **b. miRNAs intrônicos:** estão localizados dentro de um íntron de uma unidade transcricional e, geralmente, utilizam os mesmos promotores de sua unidade transcricional hospedeira; **c. miRNAs exônicos:** possuem baixa frequência e compartilham o promotor de seu gene hospedeiro. As setas representam os promotores que regulam o miRNA. Adaptado de Olena e Patton, 2010 (61).

Os miRNAs constituem uma classe de pequenos RNAs com cerca de 19 a 25 nucleotídeos não codificadores que controlam a expressão gênica por meio da repressão da tradução ou da degradação do mRNA-alvo. Conforme representado na Figura 7, os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II, sendo que os transcritos primários chamados de pri-miRNA (*primitive-miRNA*) são caracterizados por possuírem uma estrutura secundária na forma de grampo (*hairpin*) que serão processados pelo complexo microprocessador Drosha (uma RNase III) e seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region in gene 8*). Os fragmentos resultantes, pré-miRNA (*precursor mi-RNA*) com cerca de 70 nucleotídeos, também conhecidos como *hairpin*, são então, exportados do núcleo para o citoplasma pela exportina 5, onde serão clivados por uma outra RNase III chamada Dicer, que atua com a proteína TRBP (*trans-activation response RNA-binding protein*) e/ou a cinase PRKRA/PACT (*interferon-inducible doublestranded RNA-dependent activator*), que formará duas fitas simples de RNA com aproximadamente 22 nucleotídeos cada, tendo uma delas a principal ação efetora inibitória - esse se constitui no miRNA maduro (62).

Os nucleotídeos 2-7 da sequência dos miRNAs maduros formam a região semente ou “*seed*” na extremidade 5’, que determina qual o mRNA-alvo deste miRNA. O grau de especificidade da região semente é comparável àquele dos sítios do DNA reconhecidos por fatores de transcrição. Assim, múltiplos miRNAs ligam-se a sítios complementares, geralmente na região 3’ UTR de mRNAs-alvo (63).

O miRNA maduro é incorporado ao RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA) e, dependendo do grau de complementaridade entre o miRNA e seu transcrito-alvo, poderá haver degradação do mRNA ou repressão da tradução (62). O complexo RISC é capaz de reconhecer as sequências sementes específicas nas regiões 3’ UTR dos mRNAs-alvo. Isso resulta em repressão da tradução e/ou em uma diminuição

da estabilidade do mRNA-alvo. Apesar de não necessitar de uma sequência perfeita de complementaridade, a interação entre os miRNAs e seus alvos seguem regras complexas, permitindo que cada miRNA controle simultaneamente a expressão de centenas de transcrições, que, muitas vezes, codificam vários componentes da mesma via de sinalização (64).

Figura 7. Biogênese do micro RNA (miRNA) maduro. 1: O miRNA é transcrito pela RNA polimerase II formando o pri-miRNA (*primitive-miRNA*). 2: O pri-miRNA é clivado pelo complexo microprocessador Drosha (uma RNase III). 3: Formação do pré-miRNA (precursor mi-RNA). 4: O pré-miRNA é exportado do núcleo para o citoplasma pela exportina 5 (xpo-5). 5: O pré-miRNA é clivado pela Dicer. 6: Formação do miRNA maduro. 7: O miRNA maduro é incorporado ao complexo RISC. 8: Silenciamento pós-transcricional pelo complexo RISC. AGO2: Argonata 2; DGCR8: *DiGeorge syndrome critical region in gene 8*; PACT: *Protein activator of the interferon-induced protein kinase*; TNRC6: *Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein*; TRBP: *trans-activation response RNA-binding protein*;

A repressão da tradução pelo complexo RISC pode ocorrer tanto durante o início desse processo como em etapas mais tardias. No início da tradução, o RISC pode bloquear o recrutamento da subunidade ribossômica 60S ou a função cap 5', ou ainda, induzir a desadenilação que afeta a circularização do RNA-alvo e da qual participam várias proteínas. Os mecanismos posteriores ao início da tradução incluem: dissociação prematura dos ribossomos, diminuição da taxa de elongação e degradação do polipeptídeo nascente. O complexo RISC também é capaz de induzir o recrutamento dos mRNAs aos corpos de processamento no citoplasma, onde é degradado e/ou estocado em estado inativo (65).

A nomenclatura padrão dos miRNAs é composta pelo prefixo de três caracteres que indica o nome da espécie, seguido do prefixo “mir” para indicar o gene e “miR” para indicar as formas maduras, como por exemplo, hsa-miR-# utilizada para *Homo sapiens*. Adotou-se no final da nomenclatura os sufixos “-5p” ou “-3p” para indicar a extremidade do pré-miRNA da qual se origina os membros maduros (66).

A origem dos miRNAs extracelulares ainda não foi totalmente elucidada, alguns estudos sugerem potenciais mecanismos: vazamento passivo de células danificadas/mortas ou secreção celular ativa, seja pelos exossomos ou ligados a proteínas (67). Defende-se que os miRNAs secretados possam ter um papel na comunicação intercelular, de maneira que as células doadoras podem afetar a expressão gênica de células-alvo distantes ou adjacentes. Assim, os miRNAs séricos poderiam atuar em um padrão semelhante aos hormônios ou mesmo como biomarcadores para uma variedade de condições patológicas (68).

Diversos estudos já mostraram que uma parcela significativa dos miRNAs circulantes não está encapsulada em microvesículas, mas associada à proteína Argonata 2 (AGO2), principal componente do complexo RISC (69, 70). A estabilidade

dos miRNAs circulantes é explicada por essa associação, já que a proteína Argonauta é resistente à degradação.

Se os miRNAs associados a AGO2 forem liberados após a morte das células, os perfis de miRNAs extracelulares devem representar os miRNAs das células no estágio muito tardio da apoptose. Portanto, a comparação quantitativa do perfil sérico de miRNA em diferentes condições patológicas pode contribuir para a identificação da cascata de miRNAs envolvidos na apoptose (69).

A maioria dos estudos com miRNAs no contexto do DM foi realizada em modelos animais ou em cultura de células, mas já existem vários estudos em pacientes com DM, abordando a associação dos miRNAs com a secreção de insulina, com a sensibilidade à insulina e com o desenvolvimento de complicações vasculares decorrentes da hiperglicemia (71-74).

Zhao e cols. avaliaram, em portadores de DM2, a expressão de sete miRNAs mais comumente relacionados ao DM: miR-9, miR-29a, miR-30d, miR-34a, miR-124a, miR-146a e miR-375 e encontraram uma superexpressão desses em relação a indivíduos saudáveis; além disso, eles se correlacionaram negativamente com a produção, liberação e sensibilidade à insulina (75).

Nos pacientes com risco de DM1, Snowwhite e cols. encontraram associação de miRNAs séricos com autoimunidade das ilhotas pancreáticas, progressão da doença e comprometimento metabólico. O miR-92a-3p e o miR-106a-5p estavam entre os associados à autoimunidade, já os miRNAs: miR-21-3p, miR-29a-3p e o miR-424-5p foram os mais fortemente associados ao comprometimento metabólico e evolução da doença (76).

Os miRNAs também parecem participar da gênese das complicações vasculares do DM. Inúmeros estudos em modelos animais já demonstraram o envolvimento de

miRNAs na patogênese da DRD e da RD (21). Recentemente, Argyropoulos e cols. evidenciaram diferentes perfis de miRNA urinário em grupos de pacientes com diferentes estágios de DRD, o que poderá ter implicações clínicas para a estratificação de risco para essa complicação (77).

Em um estudo com biópsia renal de portadores de DM2, o miR-146a e o miR-155 apresentaram um aumento na expressão em relação ao rim de controles não diabéticos e a expressão do segundo correlacionou-se com os valores de creatinina plasmática. Ainda, em células endoteliais glomerulares humanas expostas a altas concentrações de glicose e transfectadas com miméticos desses miRNAs, houve aumento na expressão de TNF, do fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) e do NF κ B (78). Ainda na DRD, Lv e cols. observaram redução das concentrações plasmáticas de miR-130b em pacientes com essa complicação em comparação àqueles sem a mesma (79).

Em pacientes com DM2, observou-se uma associação entre lesões em podócitos e disfunção das células do túbulo proximal com a excreção de miRNAs urinários, mesmo nos pacientes normoalbuminúricos. Esta observação documenta um potencial papel de alguns miRNAs (miRNA21, miRNA124 e miRNA192) no início da DRD (80).

Em células do coração e no plasma de pacientes com DM2, observou-se um aumento na expressão do miR-34a, sendo que um dos alvos diretos deste miRNA é a SIRT1. Ingrid e colaboradores comprovaram a diminuição da expressão proteica de SIRT1, AKT e da proteína-alvo da subunidade fosfatase 1 nuclear (PNUTS), todas com ações relevantes na patogênese da cardiopatia associada ao DM. SIRT1, como já mencionado, é uma enzima implicada na desacetilação de proteínas envolvidas no estresse celular, longevidade e metabolismo da glicose. A AKT é importante na translocação de vesículas contendo o transportador de glicose GLUT4 para a membrana

nos tecidos muscular e adiposo, enquanto o PNUTS está envolvido com o metabolismo da glicose e o reparo do DNA no tecido cardíaco. Esse trabalho mostra que o DM aumenta a expressão de miR-34a tanto no coração quanto na circulação de pacientes DM2 (81).

Há poucos estudos na literatura que avaliaram a participação dos miRNAs na etiopatogenia da neuropatia diabética; as concentrações de miR-146a já foram associadas com essa complicação em estudos experimentais (82, 83).

Estudos recentes mostram que as concentrações do miR-326 estão aumentadas em células mononucleares de sangue periférico de pacientes DM1 em relação aos controles sem DM e ainda, diretamente associadas à gravidade da doença (84).

Em relação a RD, um estudo experimental realizado com células endoteliais da retina evidenciou que os miRNAs 15b e 16 participam do aparecimento desta complicação, já que o aumento da expressão dos mesmos protegeu essas células da apoptose induzida por altas concentrações de glicose (85). Em outro trabalho, Qing e cols. avaliaram o perfil dos miRNAs em soro de portadores de DM com RD e observaram que as concentrações de miR-21, miR-181c e miR1179 relacionaram-se com a RD proliferativa (86).

O miR-126-3p circulante foi mostrado como marcador não apenas de pré-diabetes, mas também da disfunção endotelial induzida pelo DM, principalmente na RD. Esse miRNA controla a expressão/sinalização de fatores angiogênicos, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator-1 derivado das células do estroma (SDF1) (87).

Embora a participação da epigenética na etiopatogenia das complicações crônicas do DM esteja sendo muito considerada, a maioria dos trabalhos publicados até o momento foi realizada em células em cultura ou em modelos de roedores diabéticos e

não compreendem mais de 101 artigos publicados na literatura. Fatores associados com a etiopatogenia das complicações diabéticas, incluindo hiperglicemia, AGEs, estresse oxidativo e fatores inflamatórios podem conduzir a alterações epigenéticas que modificam a expressão de genes em células-alvo, sem alterar sua sequência de DNA (88).

É interessante comentar que um fator que acrescenta complexidade ao entendimento das complicações diabéticas, assim como, provavelmente acontece para outras doenças poligênicas, é que deve existir a “genética da epigenética”, ou seja, variantes genéticas que predispõem a mais ou menos alterações epigenéticas frente aos desarranjos metabólicos semelhantes. É importante ressaltar, ainda, que as alterações epigenéticas são um processo dinâmico, apesar de poucos estudos na literatura abordarem a interação das vias em uma mesma doença.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

1. Caracterizar e comparar o perfil de miRNAs sérico de pacientes com DM1 sem nenhuma complicação microvascular *versus* aqueles com três complicações microvasculares: retinopatia, doença renal diabética e neuropatia diabética, para identificar vias epigeneticamente moduladas nesses dois grupos de pacientes;
2. Avaliar a frequência de polimorfismos de um único nucleotídeo nos genes que codificam a DNMT1 e a sirtuína-1 e suas associações com cada uma das complicações microvasculares em pacientes com DM1.

3. JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

Ao final deste projeto, espera-se demonstrar, em dois grupos de portadores de DM1 (com e sem complicações microvasculares) bem caracterizados e pareados quanto aos dados demográficos, clínicos e bioquímicos, diferentes perfis séricos de miRNA. Esses achados, ainda que não forneçam uma clara relação causa-efeito, podem indicar novos mecanismos regulatórios suscetíveis a modificações pela hiperglicemia crônica e identificar potenciais alvos terapêuticos.

Além disso, testamos a hipótese de que variantes em genes relacionados à desacetilação das histonas e à metilação de citosinas também podem predispor ao aparecimento das complicações diabéticas, constituindo a “genética da epigenética”.

4. METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 Seleção de Pacientes

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa e da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido os pacientes foram incluídos no estudo.

Perfil sérico de miRNAs

Para caracterizar e comparar o perfil de miRNAs sérico, foram pré-selecionados dentre os pacientes acompanhados no Ambulatório de Diabetes do HCFMUSP:

- 5 portadores de DM1 (2 do sexo masculino e 3 do sexo feminino) sem DRD (*Clearance* de creatinina $> 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ e excreção urinária de albumina $< 20 \text{ mg/g}$ de creatinina [normoalbuminúria]), sem polineuropatia sensitivo-motora distal (ausência de sintomas sugestivos de neuropatia, sensibilidade térmica e dolorosa e reflexo aquileu normais), sem neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) e sem RD e
- 5 portadores de DM1 (2 do sexo masculino e 3 do sexo feminino) com DRD (*Clearance* de creatinina $< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$, excreção urinária de albumina $> 200 \text{ mg/g}$ de creatinina e urina tipo 1 normal), com polineuropatia sensitivo-motora distal, com NAC instalada e RD moderada ou grave. Esses 10 pacientes estão pareados quanto à distribuição do sexo, duração do DM e grau de controle glicêmico expresso pela HbA1c, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Características clínicas e laboratoriais dos portadores de DM1 divididos em dois grupos, de acordo com a presença das complicações crônicas.

	Grupo Sem Complicação n=5	Grupo Com Complicação n=5
Sexo	3F / 2M	3F / 2M
Idade (anos)	37 (28 – 44)	30 (26 – 34)
IMC (kg/m²)	21,6 (19,9 – 24,7)	23,4 (22,9 – 23,9)
Duração do DM (anos)	20 (15 – 31)	23 (14 – 24)
Idade ao diagnóstico (anos)	12 (6 – 25)	8 (7,5 – 15)
Hb1Ac média (%)	8,5 (7,7 – 8,7)	8,6 (7 – 11,7)
HDL-colesterol (mg/dL)	75 (65 – 86)	56 (49 – 65)
LDL-colesterol (mg/dL)	88 (72 – 94)	85 (67 – 114)
Colesterol total (mg/dL)	170 (167 – 181)	158 (137 – 194)
Triglicérides (mg/dL)	55 (51 – 96)	64 (58 – 99)
Hipertensão Arterial (%)	0	40

Variáveis contínuas expressas pela mediana e intervalo interquartilico; variáveis categóricas expressas em porcentagem. IMC: índice de massa corpórea; n/s – não significante;

Estudo de associação de polimorfismos com as complicações microvasculares

O estudo dos SNPs nos genes *DNMT1* e *SIRT1* foi realizado em uma casuística composta por 466 pacientes acompanhados no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esses pacientes foram caracterizados quanto à presença de DRD, RD, neuropatia periférica (NP) e NAC e tiveram seu sangue periférico coletado e o DNA extraído e armazenado em *freezer* - 20°C.

4.2 Avaliação laboratorial e de variáveis clínicas

Os pacientes selecionados tinham um tempo de doença mínimo de 10 anos e uma HbA1c >8% em algum período da vida. As seguintes informações foram coletadas para os todos pacientes com DM1 incluídos no estudo: idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de diagnóstico, presença de comorbidades (com ênfase na hipertensão arterial [HAS] e na dislipidemia [DLP]), uso de medicações orais, características da insulinoterapia (tipo e doses de insulina).

Os seguintes exames complementares foram coletados no *site* HCMED (últimos exames prévios à avaliação das complicações e, em particular para a HbA1c, os últimos três exames em semestres diferentes, fazendo-se a média aritmética destes). Os seguintes métodos foram utilizados:

- Glicemia de jejum: enzimático hexoquinase;
- HbA1c: cromatografia líquida de alta performance (HPLC);
- Frutosamina: colorimétrico automatizado;
- Colesterol total, HDL colesterol: enzimático colorimétrico automatizado;
- LDL colesterol: cinético automatizado;
- Triglicérides (TG): enzimático colorimétrico automatizado;
- Creatinina plasmática: colorimétrico automatizado;

Clinicamente, os pacientes foram caracterizados quanto ao peso corpóreo, altura, índice de massa corpórea (IMC), idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de DM, presença de HAS, DLP e uso de medicamentos por meio de consulta em prontuário. A presença de complicações diabéticas microvasculares: NP, NAC, DRD e RD também foram avaliadas e classificadas conforme descrito abaixo:

❑ Neuropatia Periférica:

Para diagnóstico de NP foram realizadas as seguintes avaliações: soma das classificações obtidas no Escore de Sintomas Neuropáticos NSS (*Neuropathy Symptoms Score*) modificado e no Escore de Comprometimento Neuropático NDS (*Neuropathy Disability Score*) modificado e simplificado. Esta ferramenta diagnóstica já foi traduzida e validada para o português (89, 90).

❑ Neuropatia Autônoma Cardiovascular:

O exame de análise espectral foi realizado para a avaliação do grau de NAC. O exame é realizado no período da manhã necessitando o paciente estar em repouso, sem ingestão de café por 8 horas, em jejum de no mínimo 2 horas, sem estar em hipoglicemia e sem utilizar drogas que alterem a frequência cardíaca.

O paciente foi monitorizado e o traçado eletrocardiográfico foi avaliado pelo programa Poly-Spectrum. A vantagem da avaliação da análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca é que é um exame que não precisa de cooperação ativa do paciente. Os resultados obtidos são comparados com uma padronização baseada em faixa etária e sexo (91).

Três índices foram extraídos da análise espectral, a partir das variações espontâneas da variabilidade da frequência cardíaca de repouso:

- **Atividade parassimpática refletida pelo índice HF** (alta frequência; Variabilidade da frequência cardíaca [VFC] de alta frequência) – ao redor de 0,25 Hz, relacionado à atividade respiratória;

- **Controle simpático com a modulação vagal refletida pelo índice LF** (baixa frequência, VFC de baixa frequência) – ao redor de 0,1 Hz – relacionado ao reflexo barorreceptor;
- **Atividade simpática refletida pelo índice VLF** (muito baixa frequência, VFC de muito baixa frequência) – abaixo de 0,4 Hz, relacionado às flutuações no tônus vasomotor associado à termorregulação e à sudorese.

Em seguida, foram feitas três manobras para estudo de reflexos cardiovasculares, conhecidas como testes de Ewing:

- **Variação da frequência cardíaca (FC) à respiração profunda** (*Beat-to-beat variation with deep breathing – E [expiration] : I [inspiration] ratio*) – a variação da FC com a respiração depende da inervação parassimpática. Estando em repouso em decúbito dorsal e em monitorização eletrocardiográfica, o paciente foi orientado a realizar manobras de inspiração e expiração profunda, com duração de 5 segundos cada uma (aproximadamente 6 respirações por minuto). A variação da FC foi mensurada durante esta manobra. Com esta manobra, ocorre uma ativação do sistema simpático durante a inspiração e uma contra regulação do parassimpático durante a expiração. A razão E:I é obtida pela divisão da FC máxima pela FC mínima.
- **Relação da FC sob Manobra de Valsalva** – a resposta a esta manobra é mediada pela alternância da ativação das fibras parassimpáticas e simpáticas. Em pacientes saudáveis, o reflexo de resposta à Manobra de Valsalva inclui taquicardia e vasoconstrição periférica, seguido de bradicardia após a liberação da manobra. Estando em repouso em decúbito

dorsal e em monitorização eletrocardiográfica, o paciente foi orientado a manter uma expiração constante com força de 40 mmHg, aferida por um manômetro, durante 15 segundos. Espera-se que durante a Manobra de Valsalva o paciente faça uma taquicardia (que é máxima em torno do 14º segundo) e após ocorra uma bradicardia reflexa (que ocorre durante os 30-45 segundos seguintes a taquicardia). A razão de Valsalva é a relação entre a taquicardia e a bradicardia máximas.

- **Relação 30:15 após ortostase (*30:15 Heart rate ratio with standing*)** – em indivíduos saudáveis, há um aumento da FC em resposta à ortostase que é máxima ao redor do 15º batimento após a mudança de posição (maior atuação do simpático). Esta é seguida por uma bradicardia relativa, que é máxima ao redor do 30º batimento após a mudança de posição (maior atuação do parassimpático). Estando em repouso em decúbito dorsal e em monitorização eletrocardiográfica, o paciente foi orientado a ficar em ortostase. A avaliação da relação destes dois momentos é chamada de relação 30:15.

Os valores de normalidade para os testes avaliados de Valsalva, índice 30:15, relação E:I e análise espectral da VFC foram baseados em estudos prévios (91-93). O sétimo e último índice é a medida da queda de pressão arterial sistólica após três minutos em pé, que deve ser inferior a 20 mmHg.

No caso de alteração de mais de uma análise dentre as sete realizadas, faz-se o diagnóstico de NAC com especificidade de 100% (94); considera-se NAC incipiente quando dois testes estão alterados, NAC instalada quando três testes estão alterados e ainda, caso haja hipotensão ortostática, além de três testes alterados, é diagnosticada

NAC grave. Para a presente avaliação, foi considerada como presença de NAC clínica o diagnóstico de NAC instalada. Para análise dos dados, os pacientes foram divididos da seguinte maneira: ausência de NAC *versus* presença de NAC.

□ Doença renal diabética

A avaliação da excreção de albumina urinária foi medida em amostras isoladas de urina com o uso da metodologia de nefrolometria em pelo menos duas amostras coletadas nos seis meses prévios à consulta ou em urina de 24 horas. A razão albumina/creatinina urinária (ACR) foi utilizada para definir os estágios de albuminúria: normoalbuminúria, definida como ACR <30 mg/g de creatinina; microalbuminúria, definida como ACR 30 – 300 mg/g de creatinina e macroalbuminúria, definida como ACR >300 mg/g de creatinina. A avaliação da taxa de filtração estimada (TFGe) foi realizada pela fórmula de CKD-EPI (www.mdrd.com) (95).

A DRD foi definida como albuminúria persistente e/ou TFGe <60 mL/min/1.73m² (96, 97). Para a análise dos dados, os pacientes foram agrupados da seguinte maneira: sem DRD *versus* com DRD.

□ Retinopatia diabética:

A retina dos pacientes foi avaliada com o uso do retinógrafo (TOPCOM TRC-NW8) após dilatação da pupila com três gotas de colírio de tropicamida (10 mg/mL); foram observados e fotografados sete planos (disco ótico, mácula, lateral temporal à mácula, súpero-nasal, temporal ao disco ótico, ínfero-temporal e nasal ao disco ótico). As imagens da retina foram avaliadas por um único oftalmologista treinado e capacitado

para classificar a RD, conforme a *International Clinical Classification of Diabetic Retinopathy* (98):

- **RD não proliferativa leve:** apenas presença de microaneurismas;
- **RD não proliferativa moderada:** presença de microaneurismas, exudatos e/ou micro hemorragias. Menos eventos que a RD não proliferativa grave;
- **RD não proliferativa grave:** Presença de mais de 20 hemorragias intrarretinianas em cada um dos quatro quadrantes; “ensalsichamento” venoso em pelo menos dois quadrantes; anormalidades microvasculares intrarretinianas (IRMAs) em pelo menos um quadrante;
- **RD proliferativa:** Presença de neovascularização, hemorragia vítrea ou hemorragia pré-retiniana.

Nos casos em que os pacientes apresentavam evidências de procedimento oftalmológico que tornou impossível a classificação pelas fotos feitas com o retinógrafo, o prontuário oftalmológico foi revisado e o laudo obtido com base nestes dados. Para a análise dos dados, os pacientes foram agrupados da seguinte maneira: sem RD *versus* qualquer grau de RD.

4.3 Avaliação do perfil de miRNAs associados ao DM

O sangue periférico dos 10 pacientes com DM1 foi coletado em um tubo BD de tampa amarela com gel de separação (BD, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), específicos para separação de soro. Logo após a coleta, o tubo BD de tampa amarela foi centrifugado a 4°C por 20 minutos a 2.800 RPM.

O soro foi separado e aliquotado, sendo congelado a -80°C. Todos os 10 soros foram analisados quanto ao grau de hemólise no espectro de luz visível a 414nm e todos

que apresentaram leitura maior que 0,2 foram selecionados para a próxima etapa (99, 100). Assim, a qualidade da amostra para extração do miRNA total por Trizol (Thermofisher, EUA) e com estojo comercial *miRNeasy Mini* (Qiagen, Hilden, Alemanha) foi garantida. Antes da extração, foram adicionados à amostra 3,5 µL do *miRNeasy Serum/Plasma SpikeIn Control* (Qiagen, Hilden, Alemanha), que contém 1.6×10^8 cópias/µL do miR-39, que foi usado como controle positivo exógeno e também para verificação da conservação dos miRNAs durante a extração. Para a extração dos miRNAs circulantes no soro foram utilizadas 200 µL de cada amostra.

A quantidade e qualidade dos miRNAs obtidos foram avaliadas com o espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop, Rockland, DE, EUA). O ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para avaliar a manutenção dos miRNAs durante a extração, foi realizado com o ensaio individual *Taqman® miR-39* (Thermo Fisher Scientific) e o *Taqman® Universal Master Mix II no UNG* (Thermo Fisher Scientific).

Para a síntese e pré-amplificação de DNA complementar (cDNA) a partir do miRNA total extraído, foi utilizado o estojo comercial *Megaplex™ RT Primers, Human Pool A v2.1* (Thermo Fisher Scientific) e o termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados 2 µL do miRNA total extraído para síntese do cDNA.

Os estojos comerciais *Taqman® Human MicroRNA Array A* (Thermo Fisher scientific) e *Taqman® Universal Master Mix II no UNG* (Thermo Fisher scientific) foram usados na avaliação do perfil de miRNAs do soro de 10 amostras dos pacientes DM1 extraídas e pré-amplificadas. O estojo *Taqman® Human MicroRNA Array A* é um ensaio de PCR em tempo real com sondas de hidrólise baseadas no sistema TLDA (*Taqman Low Density Arrays*) (Thermo Fisher Scientific) que contém sondas Taqman

suficientes para a análise da expressão de 377 miRNAs, além de quatro controles endógenos, totalizando 381 miRNAs.

Essa plataforma é constituída por cartões de microfluidos independentes que distribui a amostra de cDNA em 384 poços por centrifugação (centrífuga Sorvall ST 40R; Thermo Fisher Scientific). Para prosseguir a reação é necessário realizar o *mix*, que é constituído pelo cDNA diluído (1 : 10) e pelo *Taqman® Universal Master Mix II no UNG* (Thermo Fisher Scientific) respeitando as instruções do fabricante. Em cada cartão foram distribuídos 100 µL do *mix* em cada uma das oito canaletas, sendo centrifugado em duas etapas sequenciais de um minuto por 1.200 g. Após a centrifugação, os cartões foram selados para evitar o refluxo e as canaletas foram destacadas (Figura 8). A quantificação do cDNA de cada amostra foi então realizada no aparelho Viia 7 (Thermo Fisher Scientific).

Figura 8. Placa *Taqman Low Density Arrays* (TLDA) após o processo de centrifugação e recorte das canaletas para prosseguir com a quantificação do cDNA.

Estudos demonstraram que os miRNAs circulantes são muito estáveis e resistentes ao tratamento com ribonucleases, congelamento e ao descongelamento (101). Assim, a utilização das amostras de soro congeladas a -80°C para a extração de miRNAs assegura uma degradação mínima dos mesmos.

4.4 Validação dos miRNAs

Para a validação dos miRNAs mais diferencialmente expressos, foram obtidas amostras de soro de 47 pacientes; a extração e avaliação dos miRNAs foram realizadas da mesma maneira que aquela descrita para a determinação do perfil dos miRNAs (seção anterior). Para a síntese e pré-amplificação do cDNA a partir do miRNA total extraído, foi utilizado o estojo comercial *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific) e o termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados 2 μL do miRNA total extraído para a síntese do cDNA. As características clínicas e laboratoriais dos pacientes estão demonstradas na Tabela 3.

A seleção desses 47 pacientes para a validação dos miRNAs respeitou os mesmos critérios clínicos da seleção de pacientes para o perfil sérico de miRNAs. Assim, os 27 que estavam no grupo com complicação apresentavam DRD, NP, NAC instalada e RD moderada ou grave e os 20 pacientes incluídos no grupo sem complicação não apresentavam nenhuma dessas.

Tabela 3. Características clínicas e laboratoriais dos portadores de DM1 divididos em dois grupos, de acordo com a presença das complicações crônicas para a validação dos micro-RNAs.

	Grupo Sem Complicação n=20	Grupo Com Complicação n=27	P
Sexo	14F /6M	18F /9M	NS
Idade (anos)	33 (26 – 46)	34 (30 – 40)	NS
IMC (kg/m²)	23,4 (22,0 – 25,8)	21,3 (19,2 – 23,5)	0,01
Duração do DM (anos)	17 (13 – 28)	22 (16 – 29)	NS
Idade ao diagnóstico (anos)	14 (11 – 18)	12 (8 – 16)	NS
Hb1Ac média (%)	8,15 (7,3 – 9,2)	8,26 (7 – 9,8)	NS
HDL-colesterol (mg/dL)	72 (64 – 84)	56 (40 – 72)	NS
LDL-colesterol (mg/dL)	87 (72 – 103)	88 (73 – 107)	NS
Colesterol total (mg/dL)	166 (153 – 189)	163 (142 – 188)	NS
Triglicérides (mg/dL)	65 (51 – 82)	82 (55 – 114)	NS
Hipertensão Arterial (%)	20	50	0,04

Variáveis contínuas expressas pela mediana e intervalo interquartil; variáveis categóricas expressas em porcentagem. IMC: índice de massa corpórea; n/s – não significante;

Considerado padrão-ouro, o *TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* discrimina facilmente miRNAs maduros estreitamente relacionados que se diferem por apenas uma base nitrogenada, garantindo assim alto grau de sensibilidade e especificidade de cada miRNA. O protocolo consiste em cinco etapas, demonstradas na Figura 9.

Figura 9. Preparação do micro-RNA para a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Adaptado do *Taqman Advanced miRNA assays user guide*.

Na reação de PCR em tempo real foi utilizado o *Taqman® Fast Advanced Master Mix* (Thermo Fisher scientific) e as sondas *TaqMan™ Advanced miRNA Assays* (Thermo Fisher scientific). O aparelho utilizado para quantificação do cDNA foi a *StepOne Plus* (Thermo Fisher scientific).

4.5 Estudo de polimorfismos em genes relacionados à epigenética

O gene *DNMT1* localiza-se no braço curto do cromossomo 19 (19p10.13) e cinco polimorfismos de um único nucleotídeo (rs8112895, rs7254567, rs11085721, rs17291414, rs10854076) foram selecionados com base no programa Haploview

(<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview>); esses cinco polimorfismos são capazes de capturar 99% da informação das variações alélicas da estrutura haplotípica do *DNMT1*. Foram excluídos os polimorfismos que tinham frequência do alelo raro (MAF) menor que 5%.

Também utilizando o programa Haploview, foram selecionados dois SNPs (rs10997870; rs12766485) capazes de capturar aproximadamente 50% da informação das variações alélicas da estrutura haplotípica do gene *SIRT1*, localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q21.3). Foram excluídos os polimorfismos com MAF menor que 5%.

A partir do DNA extraído de sangue periférico, foram realizadas PCR em tempo real no equipamento *StepOnePlus* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) para detecção das variantes alélicas de cada SNP. Este ensaio de genotipagem detecta as variantes alélicas de um SNP sem quantificar o alvo.

Para preparação da PCR, foram utilizados: *TaqMan Genotyping Master Mix* (conjunto de reagentes otimizados para genotipagem de SNPs, incluindo AmpliTaq Gold DNA polimerase, dNTPs sem dUTP, referência passiva e mistura de componentes otimizados) e *TaqMan SNP Genotyping Assays* (contendo duas sequências de *primers* específicos para amplificar o polimorfismo de interesse; e duas sondas alelo-específicas TaqMan MGB, para detectar os alelos do polimorfismo de interesse) (Applied Biosystems). A presença de duas sondas em cada reação permite a genotipagem das duas possíveis variantes do SNP: a sonda do alelo 1 é marcada com o *Reporter VIC*, e a sonda do alelo 2 é marcada com o *Reporter FAM*, que apresentam fluorescências diferentes durante a reação. O sinal de fluorescência gerado pela amplificação de PCR indica quais alelos estão presentes na amostra.

Durante a reação, primeiramente a sonda contendo os fluoróforos se liga à fita de DNA, essas fluorescências são chamadas *Quencher* (molécula inibidora) e *Reporter* (molécula que emitirá a fluorescência). Em seguida, o *primer* se liga à fita de DNA e à enzima Taq DNA polimerase começa a estendê-lo, adicionando os nucleosídeos. Neste momento, o *software* começa a registrar a reação. Quando a DNA polimerase encontra a sonda, o *Reporter* e o *Quencher* são separados e a emissão de fluorescência do *Reporter* não é mais absorvida pelo *Quencher*, resultando em um aumento de fluorescência, que é detectada.

O *software* StepOne normaliza a fluorescência do *Reporter dye* com o *dye* da referência passiva em cada amostra. Em seguida, o *software* coloca as intensidades normalizadas (R_n) do *Reporter dye* em um Gráfico de discriminação alélica, que contrasta as intensidades do *Reporter dye* das sondas alelo-específicas. De acordo com a posição nesse gráfico, gera-se o resultado do genótipo de cada amostra.

4.6 Análise Estatística

Nas análises dos SNPs, as variáveis contínuas estão expressas como mediana e intervalos interquartílicos 25-75% e as variáveis categóricas estão expressas como número de casos e porcentagem de indivíduos afetados. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi determinado usando-se a frequência dos alelos no teste do quiquadrado (χ^2) de Pearson ao nível de significância de 0,05 e SNPs que falharam neste teste não foram avaliados nas análises de prevalência.

Para a comparação das medianas das variáveis contínuas relativas às características clínicas entre os grupos estudados, foi utilizado o Teste de Mann-Whitney para amostras independentes; o teste do χ^2 de Pearson também foi utilizado para avaliar as diferenças nas variáveis categóricas relativas às características clínicas

iniciais entre os grupos de pacientes com e sem cada uma das complicações microvasculares estudadas, bem como a associação com a presença do SNP. A magnitude do risco conferido por cada variável significantemente diferente foi estimada pelo cálculo do *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95% pela análise de regressão logística binária. Ajustes para outras variáveis de confusão foram realizados mediante a inclusão dessas variáveis como co-variáveis no modelo de regressão.

As associações dos SNPs com as complicações crônicas microvasculares foram avaliadas por modelos de regressão logística. Para as análises realizadas com a prevalência de NP, NAC, RD e DRD, foi utilizado o modelo de regressão logística nominal. Os resultados foram expressos de acordo com o OR para presença *versus* ausência da complicação estudada no modelo de regressão logística nominal. Para o modelo co-dominante, os dados dos genótipos foram classificados de acordo com o número de alelos polimórficos (0, 1 ou 2) e o OR foi computado para o número de alelos polimórficos como variáveis quantitativas (1 vs. 0 e 2 vs. 1 cópias, com o menor número de cópias de cada par considerado como apresentando um OR de 1). Quando utilizada, a interação entre sexo e genótipo foi avaliada mediante a inclusão no modelo de regressão de uma co-variável composta “cruzada” (sexo/genótipo). Os efeitos relacionados ao genótipo foram então realizados pela nidificação da variável genótipo dentro da variável sexo, resultando no cálculo dos efeitos estatísticos para homens e mulheres separadamente e ajustado para comparações múltiplas, devido à estratificação por sexo. Ajustes para outras variáveis de confusão foram realizados mediante a inclusão dessas como co-variáveis no modelo de regressão. A correção para múltiplas comparações devido aos múltiplos SNPs testados foi feita pela correção de Meff e desta forma, foi considerado significativo um $P < 0,05$ para o SNPs da *SIRT1* e um $P < 0,01$

para os SNPs da *DNMT1*, sendo que o poder do estudo foi de 82%. As análises estatísticas foram realizadas com o *software* JMP (SAS Institute, Cary, NC) e com o *software* de livre distribuição R (102).

Para a análise do perfil de miRNAs sérico, o grupo sem complicação foi considerado o grupo de referência e uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para a obtenção do Volcano *plot*, o qual mostra os miRNAs diferentemente expressos entre os dois grupos de pacientes. O teste de Wilcoxon foi usado para comparar a expressão gênica dos cinco miRNAs diferencialmente expressos que apresentaram os menores valores de *P* entre os dois grupos de pacientes comparados.

Para as análises dos ensaios individuais de miRNAs, as expressões foram testadas com relação a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e as diferenças entre os grupos foram analisadas pelo Teste de Mann-Whitney; o valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. As variáveis clínicas e laboratoriais estão expressas como mediana $\pm$ intervalo interquartilico e o teste de Wilcoxon foi usado para comparação entre os grupos.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

6.1 Perfil de miRNAs sérico

O RNU6 foi o melhor dos quatro controles internos da reação avaliados pelo sistema TLDA, tendo em vista que foi o que se apresentou mais estável entre as amostras. Do total de 377 miRNAs-alvo avaliados, 193 estavam expressos no soro dos pacientes com DM1.

Considerando que o grupo sem complicações é o grupo referência, foi realizada uma ANOVA para a obtenção do *Volcano plot*, o qual nos mostra os miRNAs diferentemente expressos entre os dois grupos de pacientes. Um total de 21 miRNAs apresentou expressão significativamente maior no grupo com complicações, como é possível observar na Figura 10.

Figura 10. Volcano *plot* da expressão dos micro-RNAs entre os dois grupos de pacientes estudados. O grupo sem complicações foi usado como referência; cada ponto vermelho representa um micro-RNA mais expresso no grupo com complicações, considerando um $P < 0,05$.

Na Tabela 4 estão discriminados, por ordem decrescente de significância, os 21 miRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes com e sem complicações microvasculares.

Tabela 4. Lista dos micro-RNAs diferencialmente expressos entre pacientes com e sem complicações crônicas microvasculares

micro-RNA	Sequência do micro-RNA maduro	P
hsa-miR-518d-3p	CAAAGCGCUUCCCUUUGGAGC	0,001
hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	0,002
hsa-miR-126-5p	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG	0,004
hsa-miR-425-5p	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA	0,007
hsa-miR-618	AAACUCUACUUGUCCUUCUGAGU	0,008
hsa-miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG	0,010
hsa-miR-181b-5p	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	0,013
hsa-let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	0,014
hsa-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	0,015
hsa-miR-30c-5p	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	0,020
hsa-miR-574-3p	CACGCUCAUGCACACACCCACA	0,020
hsa-miR-150-5p	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	0,022
hsa-miR-106a-5p	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	0,025
hsa-miR-346	UGUCUGCCCGCAUGCCUGCCUCU	0,026
hsa-miR-548a-3p	CAAAACUGGCAAUUACUUUUGC	0,026
hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	0,027
hsa-miR-28-3p	CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA	0,029
hsa-miR-342-3p	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU	0,029
hsa-miR-130a-3p	CAGUGCAAUGUAAAAGGGCAU	0,030
hsa-let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	0,039
hsa-miR-483-5p	AAGACGGGAGGAAAGAAGGGAG	0,049

*hsa- *Homo sapiens*; $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Os resultados de expressão gênica obtidos no sistema TLDA também foram analisados pelo método de quantificação relativa (Ct, *cycle threshold*) com normalização pelo valor do gene controle interno (RNU6), utilizando-se a fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene-alvo} - Ct \text{ do controle interno RNU6}$$

Após o cálculo, foi feita a fórmula de expressão normalizada: $2^{-\Delta Ct}$. Os valores de expressão gênica foram transformados em log10 e os gráficos de expressão do hsa-miR-518d-3p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-425-5p, hsa-miR-618 estão demonstrados na Figura 11.

Figura 11. Expressão normalizada dos micro-RNAs diferencialmente expressos entre os grupos sem e com complicações microvasculares. $P < 0,05$ foi considerado significativo (teste de Wilcoxon). Estão demonstrados os dados relativos aos hsa-miRs: 518d-3p, 34a-3p, 126-5p, 425-5p e 618 (a, b, c, d e e, respectivamente).

Na análise *in silico*, buscou-se no miRTarBase os genes-alvo destes miRNAs e foi montado um diagrama de Venn, para demonstrar os genes-alvo comum aos cinco miRNAs (Figura 12). O *HOXC8* é um alvo comum entre o miR-518d-3p e o 126-5p, já o *ARIH1* e o *RBM8A* são genes-alvo comuns entre o miR-518d-3p e miR-425-5p.

Existem 11 genes-alvo comuns entre os miRs 34a-5p e o 126-5p: *NUFIP2*, *MMP7*, *HOTAIR*, *SMARCC2*, *SON*, *MYCN*, *IL6R*, *VEGFA*, *TFRC*, *MYC* e *TMOD3*.

Há 13 genes-alvo comuns entre os miRs 425-5p e o 34a-5p: *MET*, *FOXN3*, *BIRC5*, *BAZ2A*, *RRM2*, *LRRC40*, *TNFRSF10B*, *LDHA*, *CCND1*, *DHCR7*, *E2F3*, *STMN1* e *WASF2*. Entre o miR 34a-5p e o miR-618, existem quatro genes-alvo comuns: *H3F3B*, *ACSL6*, *RDH11* e o que codifica a proteína de interação com a tiorredoxina (*TXNIP*).

Os genes *ZNF148*, *AFF4* e *SPRED1* são alvos do miR-425-5p; o primeiro é comum com o miR-618 e os dois últimos com o miR126-5p. *DVL3*, *NR3C1* e o *MBD2* são genes-alvo comuns entre o miR126-5p e o miR618.

Figura 12. Diagrama de Venn representando a quantidade de genes-alvo comuns entre os cinco micro-RNAs séricos (com menores valores de *P*) diferencialmente expressos entre os grupos com e sem complicações. Esses genes-alvo foram comprovados por estudos funcionais.

6.2 Validação dos miRNAs

Baseado no resultado do perfil os miRNAs circulantes, os hsa-miRs: 518-3p, 34a-5p, 126-5p, 425-5p e 618 foram selecionados para validação em 47 pacientes selecionados. Foi adotado o *spike-in* (transcrito de sequência e quantidade conhecida adicionado à reação para servir de calibrador) exógeno cel-miR-39 no ensaio de expressão gênica. Assim, os resultados de expressão foram analisados pelo método de quantificação relativa (Ct, *cycle threshold*) com normalização pelo valor do gene controle externo (cel-miR-39), utilizando-se a fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene-alvo} - Ct \text{ do controle externo cel-miR-39}$$

Após o cálculo, foi utilizada a fórmula de expressão normalizada: $2^{-\Delta Ct}$ e os valores de expressão gênica foram transformados em log10. O cel-miR-39, não humano (*C. elegans*), foi escolhido por ser considerado um controle interno robusto, garantindo a eficiência da extração de miRNAs e a adequada normalização dos dados obtidos na PCR (103, 104).

Como se pode observar na Figura 13, tanto a expressão diferencial do miR-518d-3p quanto a do miR-618 foram validadas, sendo maiores no grupo com a presença de complicações microvasculares. Na análise *in silico* no MirTarBase, não há genes-alvo comuns entre esses dois miRNAs; existem 12 genes-alvo do miR-518d-3p e 45 do miR-618, comprovados por estudos funcionais.

Figura 13. Expressão normalizada dos micro-RNAs validados entre os grupos sem e com complicações microvasculares. $P < 0,05$ foi considerado significativo (teste de Wilcoxon). Estão demonstrados os hsa-miRs: 518d-3p, 34a-3p, 126-5p, 425-5p e 618 (a, b, c, d e e, respectivamente).

6.3 Estudo de associação de polimorfismos com as complicações microvasculares

O estudo dos SNPs nos genes *DNMT1* e *SIRT1* foi realizado em uma casuística composta por 466 pacientes. Dentro desta casuística, 285 foram caracterizados quanto à presença de NP; 295 quanto à presença de NAC; 405 quanto à presença de RD e todos os pacientes foram caracterizados quanto à presença de DRD.

Após a genotipagem desta casuística, o EHW foi determinado usando-se a frequência dos alelos no teste do quiquadrado (χ^2) de Pearson ao nível de significância de 0,05 e dois SNPs (rs12766485 no *SIRT1* e o rs8112895 no *DNMT1*) que falharam

neste teste não foram utilizados nas análises de prevalência das complicações crônicas (Tabela 5).

Tabela 5. Polimorfismos nos genes *SIRT1* e *DNMT1* caracterizados quanto ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Gene	SNP	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
<i>SIRT1</i>	rs10997870	SIM
	rs12766485	NÃO
<i>DNMT1</i>	rs8112895	NÃO
	rs17291414	SIM
	rs11085721	SIM
	rs7254567	SIM
	rs10854076	SIM

Os SNPs no *DNMT1* foram analisados quanto ao desequilíbrio de ligação, o que está demonstrado na Figura 14.

Figura 14. Desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados no gene *DNMT1*, determinado por D' (a.) e por R² (b.).

Neuropatia periférica

A Tabela 6 mostra as características clínicas e laboratoriais dos 285 pacientes com DM1 avaliados quanto à presença de NP.

Tabela 6. Características dos pacientes sem e com Neuropatia Periférica (NP)

	Ausência NP	Presença NP	Valor de <i>P</i>
Características clínicas e bioquímicas			
N	181	104	
Idade (anos)	34 (28 – 41)	39 (33 – 50)	<0,0001
Sexo (% masculino)	38	46	0,16
IMC (kg/m ²)	24 (22 – 26,4)	23,4 (21 – 26,3)	0,18
Hipertensão Arterial (%)	39	51	<0,0001
Dislipidemia (%)	40,8	54,4	0,04
Colesterol total (mg.dL ⁻¹)	171 (148 – 192)	172 (146 – 199)	0,73
HDL (mg.dL ⁻¹)	59 (48 – 73)	55 (43 – 68)	0,04
LDL (mg.dL ⁻¹)	94 (78 – 107)	94 (80 – 110)	0,46
Triglicérides (mg.dL ⁻¹)	76 (57 – 96)	84 (64 – 120)	0,02
TFGe (ml.min ⁻¹ .1.73 m ²)	104 (86 – 119)	68 (18 – 100)	<0,0001
Características do Diabetes			
Duração do Diabetes (anos)	22 (17 – 29)	27 (21 – 34)	0,0004
Idade ao diagnóstico (anos)	11 (5 – 17)	12 (7 – 18)	0,08
HbA _{1c} (%)	8,2 (7,4 – 9,2)	8,3 (7,3 – 9,8)	0,64
Frutosamina (μmol/L)	369 (328 -415)	362 (309 – 446)	0,91
Uso de medicamentos			
IECA (%)	30	40	0,04
Estatina (%)	38	53	0,01

Resultados expressos como mediana e intervalo interquartil. IMC: índice de massa corpórea; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; IECA: inibidores da enzima conversora da angiotensina; $P \leq 0,05$ foi considerado significativo

Dos 285 pacientes incluídos na avaliação, 104 apresentavam NP (36,5%). Observa-se que os pacientes com NP quando comparados aos sem NP são mais velhos (39 [33 – 50] vs. 34 [28 – 41]anos) e têm mais tempo de DM (27 [21 – 34] vs. 22 [17 –

29] anos). Em relação às comorbidades, os pacientes com NP quando comparados aos sem NP têm maior frequência de DLP (54,4% vs. 40,8%,) e de HAS (51% vs. 49%).

Os pacientes com NP, quando comparados aos sem NP, apresentam concentrações mais elevadas de TG (85 [64 – 120] vs. 76 [57 – 67] mg/dL, respectivamente), menores concentrações de HDL (55 [43 – 68] vs. 59 [48 – 73] mg/dL, respectivamente) e menores TFGe (68 [18 – 100] vs. 104 [86 – 119] mL/min/1,73m², respectivamente).

Tabela 7. Frequência dos genótipos de acordo com o *status* da neuropatia periférica (NP)

SNP	Ausência de NP	Presença de NP	OR (IC 95%)	Valor de P
N	181	104		
SIRT1				
rs10997870			0,91(0,72 – 1,65)	0,67
TT	0,304	0,245		
TG	0,450	0,521		
GG	0,246	0,234		
MAF	0,260	0,245		
DNMT1				
rs17291414			0,77 (0,43 – 1,45)	0,26
GG	0,564	0,577		
GA	0,354	0,354		
AA	0,082	0,067		
MAF	0,1767	0,1587		
rs11085721			0,85 (0,68 – 2,09)	0,55
GG	0,674	0,692		
GC	0,298	0,298		
CC	0,028	0,010		
MAF	0,177	0,159		
rs7254567			1,08 (0,61 – 1,40)	0,72
GG	0,326	0,291		
GA	0,503	0,534		
AA	0,171	0,175		
MAF	0,423	0,442		
rs10854076			0,67 (0,30 – 1,81)	0,21
GG	0,746	0,798		
GC	0,227	0,193		
CC	0,027	0,009		
MAF	0,141	0,106		

SNP: *Single nucleotide polymorphism*; MAF: frequência do alelo raro; OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança. OR para o alelo raro em um modelo co-dominante de regressão logística ajustada para idade, tempo de DM, HDL, TG, TFGe, presença de HAS, DLP e uso de inibidor da enzima conversora da angiotensina e de estatina. $P \leq 0,01$ foi considerado significativo.

É possível observar na Tabela 7 que nenhum dos SNPs estudados avaliados correlacionou-se com a presença de NP na população estudada.

Neuropatia autonômica cardiovascular

A Tabela 8 mostra as características clínicas e laboratoriais dos pacientes sem e com NAC. Dos 295 pacientes incluídos na avaliação, 88 (29,8%) apresentavam a forma clínica de NAC (três ou mais testes alterados).

Tabela 8. Características dos pacientes com e sem neuropatia autonômica cardiovascular (NAC)

	Ausência de NAC	Presença de NAC	Valor de <i>P</i>
Características clínicas e bioquímicas			
N	207	88	
Idade (anos)	37 (29 – 47)	35 (30 – 44)	0,37
Sexo (% masculino)	42	41	0,91
IMC (kg/m ²)	24 (22 – 26)	33,4 (21 – 26)	0,24
Hipertensão Arterial (%)	44	68	<0,0001
Dislipidemia (%)	43	52	0,19
Colesterol total (mg.dL ⁻¹)	171 (148 – 191)	173 (140 – 209)	0,56
HDL (mg.dL ⁻¹)	59 (46 – 74)	57 (44 – 66)	0,14
LDL (mg.dL ⁻¹)	93 (80 – 106)	96 (74 – 118)	0,43
Triglicérides (mg.dL ⁻¹)	76 (56 – 98)	91 (65 – 128)	0,0004
TFGe (ml.min ⁻¹ .1.73 m ²)	100 (78 – 115)	69 (12 – 104)	<0,0001
Características do Diabetes			
Duração do Diabetes (anos)	24 (18 – 30)	25 (19 – 31)	0,80
Idade ao diagnóstico (anos)	12 (7 – 19)	11 (5 – 16)	0,10
HbA _{1c} (%)	8,1 (7,3 – 9)	8,4 (7,5 – 10)	0,01
Frutossamina (μmol/L)	367 (322 – 415)	384 (319 – 481)	0,15
Uso de medicamentos			
IECA (%)	32	40	0,23
Estatina (%)	42	51	0,15

Resultados expressos como mediana e intervalo interquartil. IMC: índice de massa corpórea, TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; IECA: inibidores da enzima conversora da angiotensina; $P \leq 0,05$ foi considerado significativo.

Os pacientes com NAC, quando comparados aos pacientes sem NAC, apresentam maior prevalência de HAS (68% vs. 44%, respectivamente), maiores concentrações de TG (91 [66 – 128] vs. 76 [56 – 98] mg/dL, respectivamente) e de HbA1c (8,4 [7,5 – 10] vs. 8,1 [7,3 – 9,0] %, respectivamente) e menores TFG_e [69 (12 – 104) vs. 100(78 – 115) mL/min/1,73m², respectivamente].

Tabela 9. Frequência dos genótipos de acordo com o *status* da neuropatia autonômica cardiovascular (NAC)

SNP	Ausência de NAC	Presença de NAC	OR (IC 95%)	Valor de P
N	207	88		
<i>SIRT1</i>				
rs10997870			1,41 (0,94 – 2,11)	0,09
TT	0,320	0,193		
TG	0,464	0,530		
GG	0,216	0,277		
MAF	0,443	0,542		
<i>DNMT1</i>				
rs17291414			1,07 (0,61 – 1,43)	0,73
GG	0,570	0,534		
GA	0,343	0,375		
AA	0,087	0,091		
MAF	0,258	0,278		
rs11085721			1,39 (0,43 – 1,72)	0,22
GG	0,715	0,636		
GC	0,261	0,352		
CC	0,024	0,012		
MAF	0,155	0,188		
rs7254567			1,19(0,55 – 1,45)	0,38
GG	0,362	0,273		
GA	0,473	0,568		
AA	0,165	0,159		
MAF	0,401	0,443		
rs10854076			1,26 (0,49 – 1,65)	0,70
GG	0,787	0,750		
GC	0,193	0,239		
CC	0,020	0,011		
MAF	0,116	0,130		

SNP: *Single nucleotide polymorphism*; MAF: frequência do alelo raro; OR: *Odds ratio*; IC: intervalo de confiança; OR para o alelo raro em um modelo co-dominante de regressão logística ajustada para HbA1c, TG, TFG_e e presença de HAS. $P \leq 0,01$ foi considerado significativo.

É possível observar na Tabela 9 que nenhum dos SNPs avaliados correlacionou-se com a presença de NAC na população estudada.

Nas análises estratificadas por sexo, o alelo raro C do rs11085721 no gene *DNMT1* mostrou-se de risco para a população feminina, conforme mostrado na Tabela 10.

Tabela 10. Frequência dos genótipos do rs11085721 no gene *DNMT1* de acordo com o *status* da neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) no sexo feminino

SNP	Ausência de NAC	Presença de NAC	OR (95% IC)	Valor de <i>P</i>
N	121	52		
<i>DNMT1</i>				
rs11085721			2,44 (1,26 – 5,18)	0,009
GG	0,686	0,520		
GC	0,290	0,462		
CC	0,024	0,018		
MAF	0,169	0,250		

SNP: *Single nucleotide polymorphism*; MAF: frequência do alelo raro; OR: *Odds ratio*; IC: intervalo de confiança; OR para o alelo raro em um modelo dominante de regressão logística ajustada para HbA1c, TG, TFGe, presença de HAS, uso de IECA e estatina. $P \leq 0,01$ foi considerado significativo.

Retinopatia diabética

A Tabela 11 mostra as características clínicas e laboratoriais dos pacientes sem e com RD. Dos 405 pacientes incluídos na avaliação, 271 (67%) apresentavam algum grau desta complicação microvascular.

Os pacientes com RD, quando comparados aos pacientes sem RD, são mais velhos [39 (32 – 48) *vs.* 31 (25 – 41) anos, respectivamente], têm maior tempo de doença [27 (21 – 33) *vs.* 19 (14 – 24) anos, respectivamente] e maior prevalência de HAS (61% *vs.* 28%, respectivamente) e de DLP (46% *vs.* 29%, respectivamente). Os

pacientes com RD também apresentam menores TFGe quando comparados aos sem RD [86 (32 – 107) vs. 109 (90 – 120) mL/min/1,73m², respectivamente].

Tabela 11. Características dos pacientes com e sem retinopatia diabética (RD)

	Ausência de RD	Presença de RD	Valor de P
Características clínicas e bioquímicas			
N	134	271	
Idade (anos)	31 (25 – 41)	39 (32 – 48)	<0,0001
Sexo (% masculino)	38	43	0,39
IMC (kg/m ²)	24 (22 – 27)	25 (21 – 27)	0,67
Hipertensão Arterial (%)	28	61	<0,0001
Dislipidemia (%)	29	46	0,0016
Colesterol total (mg.dL ⁻¹)	171 (149 – 192)	174 (144 – 197)	0,84
HDL (mg.dL ⁻¹)	60(50 – 70)	57 (45 – 69)	0,14
LDL (mg.dL ⁻¹)	93 (77 – 107)	93 (75 – 111)	0,66
Triglicérides (mg.dL ⁻¹)	79 (59 – 110)	82 (60 – 124)	0,25
TFGe (mL.min ⁻¹ .1.73 m ²)	109 (90 – 120)	86 (32 – 107)	<0,0001
Características do Diabetes			
Duração do Diabetes (anos)	19 (14 – 24)	27 (21 – 33)	<0,0001
Idade ao diagnóstico (anos)	12 (6 – 18)	11 (6 – 18)	0,32
HbA _{1c} (%)	8,3 (7,4 – 9,5)	8,4 (7,5 – 9,5)	0,89
Frutossamina (μmol/L)	377 (339 – 439)	374 (321 – 432)	0,22
Uso de medicamentos			
IECA (%)	19	37	0,0003
Estatina (%)	34	46	0,02

Resultados expressos como mediana e intervalo interquartil. IMC: índice de massa corpórea; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; IECA: inibidores da enzima conversora da angiotensina. $P \leq 0,05$ foi considerado significativo.

É possível observar na Tabela 12 que nenhum dos SNPs avaliados correlacionou-se com a presença de RD na população estudada.

Tabela 12. Frequência dos genótipos de acordo com o *status* da retinopatia diabética (RD)

SNP	Ausência de RD	Presença de RD	OR (IC 95%)	Valor de <i>P</i>
N	134	271		
<i>SIRT1</i>				
rs10997870			0,94 (0,67 – 1,31)	0,70
TT	0,260	0,270		
TG	0,447	0,488		
GG	0,293	0,242		
MAF	0,516	0,486		
<i>DNMT1</i>				
rs17291414			1,04 (0,64 – 1,42)	0,82
GG	0,624	0,561		
GA	0,293	0,384		
AA	0,083	0,055		
MAF	0,229	0,247		
rs11085721			0,89 (0,71 – 1,73)	0,62
GG	0,672	0,679		
GC	0,299	0,299		
CC	0,029	0,022		
MAF	0,179	0,172		
rs7254567			0,81 (0,79 – 1,53)	0,55
GG	0,308	0,328		
GA	0,489	0,506		
AA	0,203	0,166		
MAF	0,447	0,419		
rs10854076			0,93 (0,67 – 1,77)	0,80
GG	0,791	0,770		
GC	0,180	0,220		
CC	0,029	0,010		
MAF	0,119	0,118		

SNP: *Single nucleotide polymorphism*; MAF: frequência do alelo raro; OR: *Odds ratio*; IC: intervalo de confiança; OR para o alelo raro em um modelo co-dominante de regressão logística ajustada para idade, tempo de DM, TFGe, presença de HAS e DLP. $P \leq 0,01$ foi considerado significativo.

Doença Renal Diabética

A Tabela 13 mostra as características clínicas e laboratoriais dos pacientes sem e com DRD. Os pacientes com DRD, quando comparados aos pacientes sem DRD, são mais velhos (40 [33 – 48] vs. 35 (28 – 45) anos, respectivamente), têm menor IMC (22,5 [20 – 26] vs. 24 [22 – 27] kg/m², respectivamente) e maior tempo de doença (27

[22 – 33] vs. 23 [17 – 31] anos, respectivamente). Adicionalmente, os pacientes com DRD apresentam maiores valores de TG (101 [71 – 114] vs. 79 [58 – 109] mg/dL, respectivamente) e maior prevalência de HAS (75% vs. 34%, respectivamente) e de dislipidemia (45,5% vs. 32%, respectivamente) que os pacientes sem DRD.

Tabela 13. Características dos pacientes com e sem doença renal diabética (DRD)

	Ausência DRD	Presença DRD	Valor de <i>P</i>
Características clínicas e bioquímicas			
N	315	151	
Idade (anos)	35 (28 – 45)	40 (33 – 48)	<0,0001
Sexo (% masculino)	42,2	45,7	0,48
IMC (kg/m ²)	24 (22 – 27)	22,5 (20 – 26)	0,0004
Hipertensão Arterial (%)	34	75	<0,0001
Dislipidemia (%)	32	45,5	0,0068
Colesterol total (mg.dL ⁻¹)	170 (148 – 193)	171 (141 – 204)	0,51
HDL (mg.dL ⁻¹)	58 (47 – 69)	56 (44 – 69)	0,22
LDL (mg.dL ⁻¹)	93 (78 – 110)	91 (70 – 114)	0,70
Triglicérides (mg.dL ⁻¹)	79 (58 – 109)	101 (71 – 142)	<0,0001
TFGe (ml.min ⁻¹ .1.73 m ²)	106 (90 – 118)	19 (8 – 51)	<0,0001
Características do Diabetes			
Duração do Diabetes (anos)	23 (17 – 31)	27 (22 – 33)	<0,0001
Idade ao diagnóstico (anos)	11 (6 – 18)	12 (8 – 17)	0,74
HbA _{1c} (%)	8,4 (7,5 – 9,4)	8,3 (7,4 – 10,2)	0,65
Frutossamina (μmol/L)	374 (333 – 427)	382 (309 – 475)	0,69
Uso de medicamentos			
IECA (%)	25,7	35,1	0,28
Estatina (%)	32,7	49,7	0,0005

Resultados expressos como mediana e intervalo interquartil. IMC: índice de massa corpórea; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; IECA: inibidores da enzima conversora da angiotensina. $P \leq 0,05$ foi considerado significativo.

É possível observar na Tabela 14 que nenhum dos SNPs avaliados correlacionou-se com a presença de DRD na população estudada.

Tabela 14. Frequência dos genótipos de acordo com o *status* da doença renal diabética (DRD)

SNP	Ausência de DRD	Presença de DRD	OR (IC 95%)	Valor de P
N	315	151		
<i>SIRT1</i>				
rs10997870			1,67(0,88 – 3,3)	0,12
TT	0,283	0,235		
TG	0,438	0,503		
GG	0,279	0,262		
MAF	0,498	0,514		
<i>DNMT1</i>				
rs17291414			1,44 (0,74 – 2,98)	0,28
GG	0,586	0,553		
GA	0,354	0,367		
AA	0,060	0,080		
MAF	0,237	0,263		
rs11085721			0,87 (0,99 – 6,60)	0,06
GG	0,667	0,700		
GC	0,311	0,273		
CC	0,022	0,027		
MAF	0,178	0,163		
rs7254567			0,62 (0,33 – 1,13)	0,11
GG	0,322	0,327		
GA	0,506	0,487		
AA	0,172	0,187		
MAF	0,430	0,425		
rs10854076			1,12 (0,29 – 1,60)	0,34
GG	0,790	0,767		
GC	0,197	0,220		
CC	0,013	0,013		
MAF	0,111	0,123		

SNP: *Single nucleotide polymorphism*; MAF: frequência do alelo raro; OR: *Odds ratio*; IC: intervalo de confiança; OR para o alelo raro em um modelo co-dominante de regressão logística ajustada para idade, tempo de DM, TG, presença de HAS e de DLP. $P \leq 0,01$ foi considerado significativo.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. Perfil miRNAs

Para identificar vias epigeneticamente moduladas em pacientes com complicações crônicas microvasculares, o perfil sérico de miRNAs foi comparado entre pacientes com DM1 com todas as complicações microvasculares *versus* pacientes sem essas complicações e 21 miRNAs diferencialmente expressos foram identificados de um total de 377 miRNAs avaliados.

Um dos primeiros miRNAs associados com as complicações diabéticas na literatura foi o miR-126-3p. Menores concentrações deste miRNA foram encontradas no soro de pacientes com DM1 com uma ou mais complicação micro/macrovacular (87). O miR-126 é altamente enriquecido nas células endoteliais e desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase endotelial e da integridade vascular (105). Além disso, o miR-126-3p é o miRNA mais abundante nos corpos apoptóticos endoteliais e regula a capacidade de resposta ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), por meio da repressão de dois reguladores negativos da via do VEGF: a proteína *sprouty* relacionada SPRED1 e a segunda subunidade reguladora da cinase do fosfoinositol-3 (PIK3R2 / p85- β), conferindo proteção vascular de maneira parácrina (106).

No nosso trabalho, o miR-126-5p (terceiro menor valor de *P* entre os dois grupos avaliados) foi encontrado em maiores concentrações nos pacientes com DM1 apresentando todas as complicações microvasculares estudadas. Esse resultado sugere que a fita do pré-miRNA da qual se origina o miRNA maduro pode influenciar na atuação epigénética; em estudos em câncer, já foram demonstrados efeitos opostos de miRNAs maduros originados de fitas diferentes do mesmo pré-miRNA (66).

O miR-126-5p é secretado pelas células endoteliais e está envolvido na proliferação das células musculares lisas vasculares. Em pacientes com doença arterial periférica, observou-se aumento da expressão sérica deste miRNA, que se associou com a presença de placas ateroscleróticas (107). Estudos experimentais mostram que essa fita do miRNA 126 é expressa principalmente em células endoteliais de artérias lesadas e tem como um dos principais alvos o *DLKI*, que impede a proliferação das células endoteliais e participa da aterosclerose (108).

Sabe-se que a seleção de um miRNA maduro (braço 3p ou 5p) pode variar entre diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento. Ainda, que as mudanças na escolha do braço podem ser muito significativas, visto que *loci* homólogos de miRNA podem desempenhar funções discrepantes apenas por apresentarem um padrão de expressão diferencial de um dos dois braços do miRNA (3p e/ou 5p)(66).

Na validação, o aumento da expressão do miR-126-5p não se confirmou nos portadores de DM1 com complicações microvasculares. Aventamos a possibilidade deste miRNA estar mais intimamente relacionado com a presença da doença cardiovascular, que não foi avaliada no presente trabalho. Li e cols. propuseram que o miR-126-5p é um potencial fator preditivo independente para a gravidade da DCV (109).

O hsa-miR-518d-3p foi o miRNA com diferença mais significativa entre os dois grupos de pacientes com DM1, e a expressão diferencial foi confirmada no experimento de validação, no qual o grupo apresentando as complicações microvasculares apresentou maior expressão sérica deste miRNA. Um importante alvo deste miRNA são os receptores ativados por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR α)(60).

O PPAR α atua como receptor nuclear da família dos fatores de transcrição e desempenha um papel crítico na homeostasia lipídica e na inflamação (110). Estudos

prévios já demonstraram que o PPAR α está significativamente diminuído na retina de modelos experimentais de DM1 e DM2, e o *knockout* de PPAR α piorou a RD. Além disso, o PPAR α mostrou efeitos protetores contra a inflamação endotelial induzida por hiperglicemia e contra a apoptose das células retinianas, por meio do bloqueio da via do Nf κ B e da melhora do estresse oxidativo na retina (111-113). O mecanismo para a redução da expressão de PPAR α na retina diabética, no entanto, ainda não está esclarecido, e o miR-518d-3p é um candidato, uma vez que todos os pacientes no grupo com complicações apresentavam a forma grave de RD. Estudos *in vitro*, demonstraram que em células do epitélio da retina, há uma correlação entre o aumento de estresse oxidativo e a expressão do miR-518d-3p (114). É interessante mencionar que há estudos que sugerem uma menor incidência de RD em pacientes expostos aos fibratos, que são agonistas do PPAR α , em comparação aos não expostos (115-117).

Em 2017, Wan e cols. mostraram que o miR-34a-5p (segundo menor valor de *P* entre os dois grupos avaliados) está relacionado ao estado de estresse oxidativo intracelular e envolvido na via de sinalização dependente do p53. Em um estudo que usou linhagens de hepatócitos, observou-se que a medida que aumentava a concentração de H₂O₂, aumentava a expressão deste miRNA (118). Levantamos a hipótese que o hsa-miR-34a-5p esteja refletindo o maior estresse oxidativo na nossa população com complicação microvascular, já que esse é o elo celular entre todas as complicações do DM, de acordo com a hipótese de Browlee (4).

Um importante alvo do miR-34a-5p é a Notch-1, uma proteína transmembrana que, quando ativada em modelos experimentais, desencadeia uma cascata que leva à desdiferenciação dos podócitos, contribuindo para o desenvolvimento da DRD (119). Estudos demonstram que a maior expressão do miR-34a-5p poderia inibir o desenvolvimento desta complicação diabética (120).

Entretanto, além da Notch-1, o miR-34a-5p também tem como alvo a sirtuína-1 (SIRT1), uma histona desacetilase dependente de NAD, que tem função principalmente anti-inflamatória e antioxidante. Um estudo recentemente publicado por nosso grupo demonstrou menor expressão de SIRT1 em células linfomononucleares periféricas de pacientes com DM1 com complicações microvasculares (121). O aumento da expressão sérica do miR-34a-5p nesta mesma população poderia sugerir que este miRNA mediasse a diminuição da SIRT1. Contudo, a expressão sérica aumentada deste miRNA não se confirmou na fase de validação.

Outro miRNA que se mostrou mais expresso no soro dos pacientes com complicações microvasculares (mas que não se confirmou na fase de validação) e que também tem como alvo a *SIRT1* é o miR-92a. Já foi demonstrado que a expressão sérica do miR-92a-5p é inversamente correlacionada com a TFG em pacientes com doença renal crônica (121).

O miR-425-5p (quarto menor valor de *P* entre os dois grupos avaliados no perfil sérico) também não teve sua maior expressão sérica confirmada no experimento de validação dos dados. Na literatura, há 33 artigos associando o miR-425-5p com a agressividade de neoplasias, principalmente com o potencial metastático em câncer gástrico e em carcinoma hepatocelular, sendo que a expressão deste miRNA tem se mostrado importante no prognóstico dessas doenças (122, 123).

No grupo com todas as complicações diabéticas selecionado para análise do perfil sérico de miRNAs, observou-se a maior expressão do miRNA-130a-3p. Em um estudo já publicado, o aumento da expressão deste miRNA foi encontrado na urina de pacientes com DRD, em comparação a pacientes sem DRD (77).

O miR-618 foi o quinto com menor valor de *P* entre os 21 miRNAs mais expressos no grupo com complicações microvasculares e essa maior expressão foi

confirmada na fase de validação. O presente estudo é o primeiro a associar a expressão do miR-618 a presença de complicações diabéticas. Dentre os mRNAs-alvo deste miRNA está a TXNIP, que interfere com a atividade antioxidante da tiorredoxina e cuja menor expressão foi observada em células linfomononucleares periféricas de DM1 com complicações microvasculares quando comparados com aqueles sem complicações (dados não mostrados(124). É possível que a maior expressão deste miRNA seja um mecanismo compensatório para reduzir a expressão da TXNIP, sabidamente aumentada em situações de hiperglicemia crônica (125).

6.2. Polimorfismos

Na busca por variantes genéticas que pudessem predispor a maiores alterações epigenéticas frente a desarranjos metabólicos semelhantes, foram selecionados SNPs em dois genes que codificam proteínas que atuam nas modificações epigenéticas.

Este é um dos raros estudos que evidencia a associação de um SNP em um gene que codifica uma proteína que participa de uma modificação epigenética com uma complicação crônica do DM. A presença do alelo raro C do rs11085721, localizado no gene *DNMT1*, mostrou-se de risco para a NAC no sexo feminino. Este SNP está localizado no segundo íntron do gene *DNMT1* e já foi associado a uma maior predisposição para a leucemia linfoblástica aguda em crianças. Não se sabe se ele, por ser um “tagSNP” em desequilíbrio de ligação com outros SNPs no mesmo gene, apenas reflita o efeito de outros SNPs funcionais ou se ele é a variante causal, pois ainda não há estudos funcionais para SNPs neste gene (126).

Na literatura há evidências de aumento da ocorrência da metilação do DNA e também da expressão da *DNMT1* em modelos experimentais e humanos de DM2

quando comparados ao grupo controle sem DM, mas pouco se sabe acerca das complicações crônicas do DM (48).

Não encontramos estudos na literatura que tenham avaliado a associação de SNPs no *DMNT1* com a presença de complicações crônicas microvasculares do DM. No entanto, já foi observado que o grau de metilação do DNA, alteração epigenética em que a DMNT1 também participa, está associado com a gravidade da RD em pacientes com DM2 (52). Por outro lado, a DRD já foi associada tanto com a hipometilação de genes alvos quanto com a hipermetilação gênômica (53, 127). No presente estudo, não foram encontradas associações de SNPs no *DMNT1* nem com a RD e nem com a DRD.

Os polimorfismos da *SIRT1* não se mostraram associados com nenhuma das complicações microvasculares estudadas na nossa população de DM1. Maeda e cols. avaliaram se algum dos oito polimorfismos da *SIRT1*, que cobriria 100% da variação alélica deste gene, estaria associado com a presença de DRD em uma população japonesa com DM2, porém este estudo encontrou apenas uma forte associação nominal (37).

A associação encontrada entre o SNP rs11085721 no gene *DNMT1* e a presença de NAC na população de pacientes do sexo feminino deve ser interpretada no contexto das limitações de um estudo transversal e investigações adicionais devem ser realizadas em uma casuística maior. No presente momento, não temos explicação para o achado da associação ter sido observada apenas em mulheres e estar restrita a NAC, não tendo sido observada nas demais complicações microvasculares. Essa associação, se confirmada, corrobora a hipótese de que a “genética da epigenética” também module o desenvolvimento e/ou progressão das complicações microvasculares.

8 CONCLUSÃO

1. O perfil de miRNAs séricos difere entre pacientes com DM1 de longa data com e sem complicações microvasculares. De um total de 377 miRNAs avaliados, 21 apresentaram-se mais expressos no grupo com complicações e dentre os cinco miRNAs validados, dois apresentaram-se mais expresso neste grupo, o hsa-miR-518d-3p e o hsa-miR-618.

2. Na população de pacientes com DM1 avaliada, não houve associação das complicações microvasculares com polimorfismos de um único nucleotídeo no gene que codifica a sirtuína-1. O polimorfismo rs11085721 no gene *DNMT1*, que codifica a enzima DNA metiltransferase 1, associou-se à presença de NAC em pacientes do sexo feminino.

9 ANEXOS

9. ANEXOS

Parecer de Aprovação da CAPPesq

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DIRETORIA CLÍNICA
COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA -
CAPPesq

CADASTRO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro (uso reservado à Secretaria da CAPPesq)	
Nº do Protocolo:	Tipo: Humanos
Instituto: FMUSP	
Registro on-line nº: 14250	Data de Entrada: 28/09/2015

Este projeto envolve:

Pacientes HC	Sim
Médicos ou Funcionários HC (como sujeitos de pesquisa)	Não
Documentos HC(Prontuários e Outros)	Sim
Materiais estocados no HC	Não
Peças anatômicas de cadáveres	Não
Haverá necessidade de recrutamento de pacientes na mídia	Não

1. Título do Protocolo de Pesquisa

Identificação de fatores epigenéticos associados a complicações crônicas em portadores de diabetes mellitus tipo 1

2. Palavras-chaves que caracterizam o assunto da Pesquisa

Diabetes tipo 1, Complicações crônicas, modificações epigenéticas, metilação DNA, SNPs.

3. Resumo do Protocolo de Pesquisa:

Vários mecanismos são propostos para explicar papel da glicotoxicidade na patogênese das complicações micro e macrovasculares do diabetes mellitus tipo 1 (DM1), como o aumento da ativação da via dos polióis, da ativação da proteína cinase C e via da hexosamina e formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Entretanto, não é incomum observarmos pacientes com duração e grau de controle metabólicos semelhantes, mas que apresentam diferenças na predisposição para o desenvolvimento das complicações. Recentemente, modificações na cromatina têm sido reconhecidas como capazes de perpetuar as complicações diabéticas, uma vez que diversos estudos já mostraram que períodos de hiperglicemia resultam em anormalidades permanentes (incluindo expressão gênica aberrante) nos tecidos alvo das complicações, fenômeno conhecido como "Memória metabólica". Essa habilidade de sustentar as complicações na ausência de hiperglicemia invoca não somente a própria glicação de proteínas de meia-vida longa, como também os mecanismos epigenéticos, quais sejam: modificações pós-traducionais nas histonas, metilação da citosina do DNA e controle da

expressão gênica por micro-RNAs não codificantes. Esses processos permitem que as células respondam rapidamente às mudanças ambientais, ao mesmo tempo em que se tornam capazes de “memorizar” essas respostas mesmo após a remoção do estímulo que as causou. Um fator que acrescenta complexidade ao entendimento das complicações diabéticas é que deve existir a “genética da epigenética”, ou seja, variantes genéticas que predisõem a mais ou menos alterações epigenéticas frente a desarranjos metabólicos semelhantes. Embora a participação da epigenética na etiopatogenia das complicações crônicas do DM esteja sendo muito considerada, a maioria dos trabalhos até o momento publicados foram realizados em células em cultura ou em modelos de roedores diabéticos. Objetivo: caracterizar e comparar (1) o perfil de metilação do DNA de células mononucleares de sangue periférico e (2) o perfil de miRNAs plasmático de portadores de DM1 sem nenhuma complicação microvascular versus aqueles com três complicações microvasculares: retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética, para identificar vias epigeneticamente moduladas nesses dois grupos de pacientes. Adicionalmente, serão estudadas a frequência de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) nos genes que codificam a DNA metiltransferase 1 (DNMT1, uma das enzimas responsáveis pela metilação da citosina) e a sirtuína-1 (SIRT1, uma histona desacetilase) e suas associações com cada uma das complicações microvasculares em portadores de DM1.

4. Pesquisador Responsável:

Maria Lucia Cardillo-Corrêa Giannella

<http://lattes.cnpq.br/520567634459319>

Graduação: Medicina

Vínculo: FMUSP

5. Pesquisador Executante:

Daniele Pereira dos Santos

<http://lattes.cnpq.br/8958113666528406>

6. Possui co-autores?

Sim

Nome dos co-autores: Giovanni Vitale

7. Onde a Pesquisa será realizada?

Departamento: Clínica Médica

Disciplina: Endocrinologia e Metabologia

LIM: LIM/25 - Lab Endocrinologia Celular e Molecular

8. Existe entidade externa envolvida?

Sim

University of Milan, Faculty of Medicine, Milan (Italy)

Internacional

9. Possui participação Estrangeira

Sim

10. O projeto é multicêntrico

Não

11. Outros serviços/ divisões do HCFMUSP envolvidos na pesquisa

Não

12. Finalidade acadêmica da pesquisa e classificação

Doutorado

Outros:

Orientador: Maria Lucia Cardillo-Corrêa Giannella

13. Investigação

Prospectiva

14. Materiais e métodos

Laboratorial

Prontuários de pacientes

Tecidos, órgãos, fluidos orgânicos

15. Gênero, classificação da Pesquisa

Clínica

16. Áreas temáticas previstas na Res. 466/12

Genética Humana

17. Patrocínio

Outros

Financiamento Próprio

18. Valor do financiamento

80.000,00

19. Cronograma de execução da pesquisa

Prazo: 48 meses

20. Assinaturas

Assinatura e carimbo do Pesquisador

Aprovado em

Profª Dra. Maria Lúcia C.C. Giannella
Profª Associada - FMUSP
USP 4851205

Assinatura e carimbo da Chefia
com data de aprovação
pelo Conselho do Departamento
____/____/____.

Aprovado em

Aprovado "ad-referendum" o encaminhamento à Comissão
de Ética de Projetos de Pesquisa - CAPPesq 05/11/15

Prof. Dr. Wilson Jacobs Filho
Vice Chefe do Departamento de Clínica Médica

FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Secretaria de Pós-Graduação Disciplina de Endocrinologia HC/FMUSP
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 - Pamb - 8º andar - Bloco 3 -
CEP: 05403-000 - São Paulo - SP - Tel/Fax: (11) 2661-7694
e-mail: cpgeendoc.iche@hc.fm.usp.br

CPGE/025/15

São Paulo, 28 de outubro de 2015.

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Ana Claudia Latronico Xavier Chefe do Departamento de Clínica Médica
da Faculdade de Medicina da USP

Prezada Professora,

Venho por meio desta encaminhar para aprovação 2(duas) vias da Folha de Rosto para pesquisa envolvendo seres humanos e 2 (duas) vias do Cadastro de Protocolo de Pesquisa referente ao do Projeto de Pesquisa **"Identificação de fatores epigenéticos associados a complicação crônicas em portadores de diabetes mellitus tipo 1"** Pesquisador Responsável e Orientadora **Profa. Dra. Maria Lucia Cardillo Correa Giannella** e Pesquisadora Executante **aluna Daniele Pereira dos Santos**, Curso de **Doutorado**, Programa de Pós-Graduação da Unidade de Diabetes da Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Berenice Biliharinho de Mendonça
Professora Titular
Disciplina de Endocrinologia e Metabolgia
Departamento de Clínica Médica - FMUSP

05,11,15
Daniele Pereira dos Santos
Departamento de Clínica Médica - FMUSP

Parecer de aprovação da Plataforma Brasil

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

Título da Pesquisa: Identificação de fatores epigenéticos associados a complicações crônicas em portadores de diabetes mellitus tipo 1

Pesquisador: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 3

CAAE: 50863115.5.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.433.880

Apresentação do Projeto:

adequada

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos desse projeto são caracterizar e comparar (1) o perfil de metilação do DNA de células mononucleares de sangue periférico e (2) o perfil de miRNAs plasmático de portadores de DM1 sem nenhuma complicação microvascular versus aqueles com três complicações microvasculares: retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética, para identificar vias epigeneticamente moduladas nesses dois grupos de pacientes.

Adicionalmente, iremos estudar a frequência de polimorfismos de um único nucleotídeo no gene que codifica a DNMT1 e a sirtuína-1 e suas associações com cada uma das complicações crônicas em portadores de DM1.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não há benefícios e os riscos são mínimos inerentes da punção de sangue periférico

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.433.880

não há

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

adequada

Recomendações:

não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_599422.pdf	16/02/2016 11:45:20		Aceito
Outros	carta_pb_2.docx	16/02/2016 11:44:37	Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella	Aceito
Outros	carta_PB.docx	16/12/2015 09:52:55	Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controle.doc	08/12/2015 11:06:41	Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	08/12/2015 11:06:27	Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella	Aceito
Outros	cappesqaprovado.pdf	09/11/2015 11:44:26	Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	09/11/2015 11:40:12	Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.433.880

Declaração de Pesquisadores	Agreement_Daniele_Brazil.pdf	08/10/2015 15:10:12	Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	28/09/2015 12:41:20	Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Doutorado.docx	28/09/2015 12:38:38	Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 02 de Março de 2016

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME: .....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE nº: ..... SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
 ENDEREÇO: ..... nº: ..... APTO: .....
 BAIRRO: ..... CIDADE: .....
 CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE nº: ..... SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
 ENDEREÇO: ..... nº: ..... APTO: .....
 BAIRRO: ..... CIDADE: .....
 CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Identificação de fatores epigenéticos associados a complicações crônicas em portadores de diabetes mellitus tipo 1

PESQUISADOR : Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella

CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente e Professora Pesquisadora INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 2926

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO **X** RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 10/11/2015 a 30/11/2018

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

O diabetes melito é uma doença que se caracteriza por aumento da glicemia (açúcar no sangue) e o seu descontrole por um longo tempo pode levar ao desenvolvimento de complicações como diminuição ou perda da visão, problemas nos rins e nos nervos. Assim, o/a senhor(a) está convidado(a) a participar da nossa pesquisa que tem como objetivo relacionar o aparecimento de complicações diabéticas (na retina, nos nervos e nos rins) com a expressão de marcadores nas células do sangue.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros

Caso o(a) Senhor(a) concorde em participar deste estudo, iremos coletar 16 mL de seu sangue de uma veia de seu braço para a extração RNA e DNA (material genético). Este material será usado no estudo da expressão de genes envolvidos na susceptibilidade do aparecimento de complicações do diabetes melito.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos

Somente será realizada a coleta de sangue (16mL) de uma veia de seu braço para a extração de DNA e RNA (material genético).

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3

O único desconforto que o (a) Sr.(a) sentirá será uma picada no seu braço para a retirada do sangue onde será realizada a pesquisa no seu material genético. Os riscos mais comuns deste procedimento são: formação de hematomas, pequeno sangramento local e dor. Outros menos frequentes que podem ocorrer são punção acidental de uma artéria, anemia por sangramento, infecção e lesão nervosa. Esses riscos são raros e são minimizados pelos cuidados tomados pelo enfermeiro no momento da punção. Caso ocorra algum problema após a coleta do sangue, o (a) Sr (a) será atendido no próprio ambulatório médico do Hospital das Clínicas pelo médico responsável pela pesquisa. O (a) Sr (a) tem garantia de assistência, acompanhamento e indenização caso ocorra algum dano relacionado aos procedimentos efetuados para esta pesquisa conforme a Resolução CNS 196/96.

5 – Benefícios para o participante

Não há benefício direto para o participante, pois não será oferecido o aconselhamento genético. Existe a possibilidade de que após a realização desse estudo, sejam identificados fatores genéticos que aumentam o risco para o desenvolvimento das complicações associadas ao diabetes. Com isso, no

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

futuro, poderemos diagnosticar e tratar com precisão os portadores de diabetes, identificar em familiares os que têm risco de ter diabetes e indicar a prioridade para futuras estratégias de prevenção e de controle intensivo dos portadores de diabetes com maior risco de desenvolver essas doenças associadas.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar

Como a retirada do sangue para a pesquisa do material genético não é um procedimento para tratamento, não há procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o(a) Sr(a), caso o Sr (a) opte por não retirar o sangue.

7 – Garantia de acesso

Em qualquer etapa do estudo, o (a) Sr(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella; Telefone(s) 3061-7253, ramal 13. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – O (A) Sr (a) tem liberdade para retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência médica que o Sr. (a) recebe no Hospital das Clínicas.

9 – Direito de confidencialidade: Todos os dados obtidos, tais como: resultados de exames e testes, bem como do prontuário, somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos e não será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.), de forma a impedir qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva no caso de resultados indicativos de desenvolvimento de diabetes ou de suas complicações. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

10 – O (A) Sr(a) tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Todos os procedimentos necessários para o estudo serão realizados no dia de sua consulta. Caso haja despesas adicionais com transporte e alimentação, por necessidade de comparecimento ao ambulatório fora do dia da sua consulta, serão ressarcidas.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado em outras pesquisas apenas com autorização do paciente

Da amostra de sangue cedida pelo(a) Sr(a) será extraído DNA e RNA (material genético) que poderão ser utilizados em outras pesquisas que também tenham o objetivo de prevenir ou estudar as complicações decorrentes do diabetes. Para que seu material genético possa ser armazenado e usado em outras pesquisas é necessária sua autorização. Por favor, informe abaixo se existe a necessidade de consultá-lo(a) para autorizar o uso do seu material biológico em outras pesquisas científicas.

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

(.....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

(.....) NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

Se o(a) Sr(a). concordar em doar este material para outras futuras pesquisas científicas ele será armazenado no Biorrepositório do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25) da Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo, permanecendo sob a responsabilidade institucional da Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella.

O prazo de armazenamento do seu material biológico no Biorrepositório do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25) será de acordo com o cronograma da pesquisa, sendo que o prazo máximo é de 10 anos.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o projeto de pesquisa "Estudo da associação entre as complicações microvasculares e a expressão de receptores para produtos finais de glicação avançada em células mononucleares de portadores de diabetes mellitus tipo 1."

Eu discuti com a Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

permanentes. Ficou claro também, que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____
Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

10 REFERÊNCIAS

10. REFERÊNCIAS

1. Bjerg L, Hulman A, Charles M, Jørgensen ME, Witte DR. Clustering of microvascular complications in Type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 2018.
2. Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, et al. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care*. 2005;28(9):2130-5.
3. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c12.def>.
4. M B, LP A, E F, AI V, RW N, AJM B. Complications of Diabetes mellitus. *Willians Text Book of Endocrinology*. Tenth ed: Philadelphia: Saunders; 2003.
5. Khalil H. Diabetes microvascular complications-A clinical update. *Diabetes Metab Syndr*. 2016.
6. Maric-Bilkan C. Sex differences in micro- and macro-vascular complications of diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131(9):833-46.
7. McVicar CM, Ward M, Colhoun LM, Guduric-Fuchs J, Bierhaus A, Fleming T, et al. Role of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in retinal vasodegenerative pathology during diabetes in mice. *Diabetologia*. 2015.
8. Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA*. 2002;288(20):2579-88.

9. Manigrasso MB, Juranek J, Ramasamy R, Schmidt AM. Unlocking the biology of RAGE in diabetic microvascular complications. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(1):15-22.
10. Perfil da Doença Renal Crônica. O Desafio Brasileiro. Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2007. Sociedade Brasileira de Nefrologia 2007.
11. Bansal V, Kalita J, Misra UK. Diabetic neuropathy. *Postgrad Med J.* 2006;82(964):95-100.
12. Jaiswal M, Divers J, Urbina EM, Dabelea D, Bell RA, Pettitt DJ, et al. Cardiovascular autonomic neuropathy in adolescents and young adults with type 1 and type 2 diabetes: The SEARCH for Diabetes in Youth Cohort Study. *Pediatr Diabetes.* 2018.
13. Khandoker AH, Imam MH, Couderc JP, Palaniswami M, Jelinek HF. QT variability index changes with severity of cardiovascular autonomic neuropathy. *IEEE Trans Inf Technol Biomed.* 2012;16(5):900-6.
14. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010;107(9):1058-70.
15. Genuth S, Sun W, Cleary P, Sell DR, Dahms W, Malone J, et al. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005;54(11):3103-11.

16. Orchard TJ, Lyons TJ, Cleary PA, Braffett BH, Maynard J, Cowie C, et al. The association of skin intrinsic fluorescence with type 1 diabetes complications in the DCCT/EDIC study. *Diabetes Care*. 2013;36(10):3146-53.
17. Corrêa-Giannella ML, Vieira SM. [Genetic susceptibility to microangiopathy development in Type 1 diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(2):375-86.
18. Vieira SM, Monteiro MB, Marques T, Luna AM, Fortes MA, Nery M, et al. Association of genetic variants in the promoter region of genes encoding p22phox (CYBA) and glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) and renal disease in patients with type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genet*. 2011;12:129.
19. Mohammadi K, Patente TA, Bellili-Muñoz N, Driss F, Monteiro MB, Roussel R, et al. Catalase activity, allelic variations in the catalase gene and risk of kidney complications in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2013;56(12):2733-42.
20. Monteiro MB, Patente TA, Mohammadi K, Queiroz MS, Azevedo MJ, Canani LH, et al. Sex-specific associations of variants in regulatory regions of NADPH oxidase-2 (CYBB) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) genes with kidney disease in type 1 diabetes. *Free Radic Res*. 2013;47(10):804-10.
21. Intine RV, Sarras MP. Metabolic memory and chronic diabetes complications: potential role for epigenetic mechanisms. *Curr Diab Rep*. 2012;12(5):551-9.
22. Group DCaCTDEoDiACESR. Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Outcomes in Type 1 Diabetes: The DCCT/EDIC Study 30-Year Follow-up. *Diabetes Care*. 2016;39(5):686-93.

23. Aiello LP, Group DER. Diabetic retinopathy and other ocular findings in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care*. 2014;37(1):17-23.
24. Martin CL, Albers JW, Pop-Busui R, Group DER. Neuropathy and related findings in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care*. 2014;37(1):31-8.
25. Prattichizzo F, Giuliani A, Ceka A, Rippo MR, Bonfigli AR, Testa R, et al. Epigenetic mechanisms of endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):56.
26. Müller MM, Muir TW. Histones: at the crossroads of peptide and protein chemistry. *Chem Rev*. 2015;115(6):2296-349.
27. Villeneuve LM, Reddy MA, Natarajan R. Epigenetics: deciphering its role in diabetes and its chronic complications. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011;38(7):451-9.
28. Ho E, Clarke JD, Dashwood RH. Dietary sulforaphane, a histone deacetylase inhibitor for cancer prevention. *J Nutr*. 2009;139(12):2393-6.
29. Eberharter A, Becker PB. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep*. 2002;3(3):224-9.
30. Miao F, Gonzalo IG, Lanting L, Natarajan R. In vivo chromatin remodeling events leading to inflammatory gene transcription under diabetic conditions. *J Biol Chem*. 2004;279(17):18091-7.

31. Miao F, Chen Z, Genuth S, Paterson A, Zhang L, Wu X, et al. Evaluating the role of epigenetic histone modifications in the metabolic memory of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2014;63(5):1748-62.
32. Sayyed SG, Gaikwad AB, Lichtnekert J, Kulkarni O, Eulberg D, Klusmann S, et al. Progressive glomerulosclerosis in type 2 diabetes is associated with renal histone H3K9 and H3K23 acetylation, H3K4 dimethylation and phosphorylation at serine 10. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(6):1811-7.
33. Kitada M, Kume S, Kanasaki K, Takeda-Watanabe A, Koya D. Sirtuins as possible drug targets in type 2 diabetes. *Curr Drug Targets*. 2013;14(6):622-36.
34. Mishra M, Duraisamy AJ, Kowluru RA. Sirt1- A Guardian of the Development of Diabetic Retinopathy. *Diabetes*. 2018.
35. Mendes KL, Lelis DF, Santos SHS. Nuclear sirtuins and inflammatory signaling pathways. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2017;38:98-105.
36. Zheng Z, Chen H, Li J, Li T, Zheng B, Zheng Y, et al. Sirtuin 1-mediated cellular metabolic memory of high glucose via the LKB1/AMPK/ROS pathway and therapeutic effects of metformin. *Diabetes*. 2012;61(1):217-28.
37. Maeda S, Koya D, Araki S, Babazono T, Umezono T, Toyoda M, et al. Association between single nucleotide polymorphisms within genes encoding sirtuin families and diabetic nephropathy in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Clin Exp Nephrol*. 2011;15(3):381-90.

38. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 2007;129(4):823-37.
39. Miao F, Wu X, Zhang L, Yuan YC, Riggs AD, Natarajan R. Genome-wide analysis of histone lysine methylation variations caused by diabetic conditions in human monocytes. *J Biol Chem*. 2007;282(18):13854-63.
40. Zhong Q, Kowluru RA. Epigenetic changes in mitochondrial superoxide dismutase in the retina and the development of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2011;60(4):1304-13.
41. Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S, et al. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet*. 2007;3(10):2023-36.
42. Rondelet G, Wouters J. Human DNA (cytosine-5)-methyltransferases: A functional and structural perspective for epigenetic cancer therapy. *Biochimie*. 2017.
43. Bansal A, Pinney SE. DNA methylation and its role in the pathogenesis of diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2017;18(3):167-77.
44. Jin B, Robertson KD. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2013;754:3-29.
45. Mishra M, Kowluru RA. Epigenetic Modification of Mitochondrial DNA in the Development of Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(9):5133-42.

46. Yang BT, Dayeh TA, Volkov PA, Kirkpatrick CL, Malmgren S, Jing X, et al. Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol.* 2012;26(7):1203-12.
47. Mishra M, Kowluru RA. The Role of DNA Methylation in the Metabolic Memory Phenomenon Associated With the Continued Progression of Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(13):5748-57.
48. Chen YT, Lin WD, Liao WL, Lin YJ, Chang JG, Tsai FJ. PTPRD silencing by DNA hypermethylation decreases insulin receptor signaling and leads to type 2 diabetes. *Oncotarget.* 2015;6(15):12997-3005.
49. Turunen MP, Aavik E, Ylä-Herttuala S. Epigenetics and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1790(9):886-91.
50. Williams KT, Garrow TA, Schalinske KL. Type I diabetes leads to tissue-specific DNA hypomethylation in male rats. *J Nutr.* 2008;138(11):2064-9.
51. Williams KT, Schalinske KL. Tissue-specific alterations of methyl group metabolism with DNA hypermethylation in the Zucker (type 2) diabetic fatty rat. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012;28(2):123-31.
52. Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Larijani B, Amini M, Keshtkar A. Global DNA methylation as a possible biomarker for diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2014.
53. Maghbooli Z, Larijani B, Emamgholipour S, Amini M, Keshtkar A, Pasalar P. Aberrant DNA methylation patterns in diabetic nephropathy. *J Diabetes Metab Disord.* 2014;13:69.

54. Bell CG, Teschendorff AE, Rakyan VK, Maxwell AP, Beck S, Savage DA. Genome-wide DNA methylation analysis for diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genomics*. 2010;3:33.
55. Sapienza C, Lee J, Powell J, Erinle O, Yafai F, Reichert J, et al. DNA methylation profiling identifies epigenetic differences between diabetes patients with ESRD and diabetes patients without nephropathy. *Epigenetics*. 2011;6(1):20-8.
56. Xu L, Zheng D, Wang L, Jiang D, Liu H, Liao Q, et al. GCK gene-body hypomethylation is associated with the risk of coronary heart disease. *Biomed Res Int*. 2014;2014:151723.
57. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-62.
58. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):858-62.
59. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):862-4.
60. Available from: <http://www.mirbase.org/>.
61. Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol*. 2010;222(3):540-5.
62. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015.

63. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-9.
64. Regazzi R. MicroRNAs as therapeutic targets for the treatment of diabetes mellitus and its complications. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(2):153-60.
65. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci*. 2010;101(11):2309-15.
66. Campos Pereira T. Introdução ao mundo dos microRNAs 2015.
67. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*. 2012;22(3):125-32.
68. Schneider A, Victoria B, Lopez YN, Suchorska W, Barczak W, Sobecka A, et al. Tissue and serum microRNA profile of oral squamous cell carcinoma patients. *Sci Rep*. 2018;8(1):675.
69. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(16):7223-33.
70. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(12):5003-8.
71. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004;432(7014):226-30.

72. El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2008;57(10):2708-17.
73. Zhao H, Guan J, Lee HM, Sui Y, He L, Siu JJ, et al. Up-regulated pancreatic tissue microRNA-375 associates with human type 2 diabetes through beta-cell deficit and islet amyloid deposition. *Pancreas*. 2010;39(6):843-6.
74. Shantikumar S, Caporali A, Emanuelli C. Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications. *Cardiovasc Res*. 2012;93(4):583-93.
75. Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetol*. 2011;48(1):61-9.
76. Snowwhite IV, Allende G, Sosenko J, Pastori RL, Messinger Cayetano S, Pugliese A. Association of serum microRNAs with islet autoimmunity, disease progression and metabolic impairment in relatives at risk of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(8):1409-22.
77. Argyropoulos C, Wang K, McClarty S, Huang D, Bernardo J, Ellis D, et al. Urinary microRNA profiling in the nephropathy of type 1 diabetes. *PLoS One*. 2013;8(1):e54662.
78. Huang Y, Liu Y, Li L, Su B, Yang L, Fan W, et al. Involvement of inflammation-related miR-155 and miR-146a in diabetic nephropathy: implications for glomerular endothelial injury. *BMC Nephrol*. 2014;15:142.

79. Lv C, Zhou YH, Wu C, Shao Y, Lu CL, Wang QY. The changes in miR-130b levels in human serum and the correlation with the severity of diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2015.
80. Milas O, Gadalean F, Vlad A, Dumitrascu V, Gluhovschi C, Gluhovschi G, et al. Deregulated profiles of urinary microRNAs may explain podocyte injury and proximal tubule dysfunction in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes mellitus. *J Investig Med*. 2017.
81. Fomison-Nurse I, Saw EEL, Gandhi S, Munasinghe PE, Van Hout I, Williams MJA, et al. Diabetes induces the activation of pro-ageing miR-34a in the heart, but has differential effects on cardiomyocytes and cardiac progenitor cells. *Cell Death Differ*. 2018.
82. Lu Y, Cao L, Jiang BC, Yang T, Gao YJ. MicroRNA-146a-5p attenuates neuropathic pain via suppressing TRAF6 signaling in the spinal cord. *Brain Behav Immun*. 2015.
83. Yousefzadeh N, Alipour MR, Soufi FG. Deregulation of NF- κ B-miR-146a negative feedback loop may be involved in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J Physiol Biochem*. 2015;71(1):51-8.
84. Zullo A, Sommese L, Nicoletti G, Donatelli F, Mancini FP, Napoli C. Epigenetics and type 1 diabetes: mechanisms and translational applications. *Transl Res*. 2017;185:85-93.

85. Ye EA, Steinle JJ. miR-15b/16 protects primary human retinal microvascular endothelial cells against hyperglycemia-induced increases in tumor necrosis factor alpha and suppressor of cytokine signaling 3. *J Neuroinflammation*. 2015;12(1):44.
86. Qing S, Yuan S, Yun C, Hui H, Mao P, Wen F, et al. Serum miRNA biomarkers serve as a fingerprint for proliferative diabetic retinopathy. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34(5):1733-40.
87. Barutta F, Bruno G, Matullo G, Chaturvedi N, Grimaldi S, Schalkwijk C, et al. MicroRNA-126 and micro-/macrovascular complications of type 1 diabetes in the EURODIAB Prospective Complications Study. *Acta Diabetol*. 2017;54(2):133-9.
88. Li Y, Zhou Q, Pei C, Liu B, Li M, Fang L, et al. Hyperglycemia and Advanced Glycation End Products Regulate miR-126 Expression in Endothelial Progenitor Cells. *J Vasc Res*. 2016;53(1-2):94-104.
89. Moreira RO, Castro AP, Papelbaum M, Appolinário JC, Ellinger VC, Coutinho WF, et al. Tradução para o Português e Avaliação da Confiabilidade de Uma Escala para Diagnóstico da Polineuropatia Distal Diabética. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2005;49(6):944-50.
90. Boulton AJM. Management of Diabetic Peripheral Neuropathy. *Clinical diabetes*. 2005:1-7.
91. Agelink MW, Malessa R, Baumann B, Majewski T, Akila F, Zeit T, et al. Standardized tests of heart rate variability: normal ranges obtained from 309 healthy humans, and effects of age, gender, and heart rate. *Clinical autonomic research : official journal of the Clinical Autonomic Research Society*. 2001;11(2):99-108.

92. Ewing DJ, Clarke BF. Diagnosis and management of diabetic autonomic neuropathy. *British medical journal*. 1982;285:916-8.
93. Ziegler D, Laux G, Dannehl K, Spuler M, Muhlen H, Mayer P, et al. Assessment of Cardiovascular Autonomic Function: Age-related Normal Ranges and Reproducibility of Spectral Analysis, Vector Analysis, and Standard Tests of Heart Rate Variation and Blood Pressure Responses. *Diabetic Medicine*. 1992;9:166-75.
94. Vinik AI, Ziegler D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Circulation*. 2007;115(3):387-97.
95. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009;150(9):604-12.
96. Pacilli A, Viazzi F, Fioretto P, Giorda C, Ceriello A, Genovese S, et al. Epidemiology of diabetic kidney disease in adult patients with type 1 diabetes in Italy: The AMD-Annals initiative. *Diabetes Metab Res Rev*. 2017;33(4).
97. Association AD. 10. Microvascular Complications and Foot Care. *Diabetes Care*. 2017;40(Suppl 1):S88-S98.
98. Wilkinson CP, Ferris FL, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*. 2003;110(9):1677-82.
99. Kirschner MB, Edelman JJ, Kao SC, Vallely MP, van Zandwijk N, Reid G. The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Front Genet*. 2013;4:94.

100. Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ, Armstrong NJ, Vallely MP, van Zandwijk N, et al. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One*. 2011;6(9):e24145.
101. Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(9):513-21.
102. Kirby KN, Gerlanc D. BootES: an R package for bootstrap confidence intervals on effect sizes. *Behav Res Methods*. 2013;45(4):905-27.
103. Salvoza NC, Klinzing DC, Gopez-Cervantes J, Bacig MO. Association of Circulating Serum miR-34a and miR-122 with Dyslipidemia among Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153497.
104. Mooren FC, Viereck J, Krüger K, Thum T. Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;306(4):H557-63.
105. Sebastiani G, Nigi L, Grieco GE, Mancarella F, Ventriglia G, Dotta F. Circulating microRNAs and diabetes mellitus: a novel tool for disease prediction, diagnosis, and staging? *J Endocrinol Invest*. 2017;40(6):591-610.
106. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res*. 2010;107(6):810-7.
107. Aquila G, Fortini C, Pannuti A, Delbue S, Pannella M, Morelli MB, et al. Distinct gene expression profiles associated with Notch ligands Delta-like 4 and

Jagged1 in plaque material from peripheral artery disease patients: a pilot study. *J Transl Med.* 2017;15(1):98.

108. Schober A, Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Bidzhekov K, Gremse F, Grommes J, et al. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. *Nat Med.* 2014;20(4):368-76.

109. Li HY, Zhao X, Liu YZ, Meng Z, Wang D, Yang F, et al. Plasma MicroRNA-126-5p is Associated with the Complexity and Severity of Coronary Artery Disease in Patients with Stable Angina Pectoris. *Cell Physiol Biochem.* 2016;39(3):837-46.

110. Zhao C, Zhang T, Shi Z, Ding H, Ling X. MicroRNA-518d regulates PPAR α protein expression in the placentas of females with gestational diabetes mellitus. *Mol Med Rep.* 2014;9(6):2085-90.

111. Chen Q, Qiu F, Zhou K, Matlock HG, Takahashi Y, Rajala RVS, et al. Pathogenic Role of microRNA-21 in Diabetic Retinopathy Through Downregulation of PPAR α . *Diabetes.* 2017;66(6):1671-82.

112. Hu Y, Chen Y, Ding L, He X, Takahashi Y, Gao Y, et al. Pathogenic role of diabetes-induced PPAR- α down-regulation in microvascular dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(38):15401-6.

113. Moran E, Ding L, Wang Z, Cheng R, Chen Q, Moore R, et al. Protective and antioxidant effects of PPAR α in the ischemic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(7):4568-76.

114. Ayaz L, Dinç E. Evaluation of microRNA responses in ARPE-19 cells against the oxidative stress. *Cutan Ocul Toxicol.* 2017:1-6.

115. Morgan CL, Owens DR, Aubonnet P, Carr ES, Jenkins-Jones S, Poole CD, et al. Primary prevention of diabetic retinopathy with fibrates: a retrospective, matched cohort study. *BMJ Open*. 2013;3(12):e004025.
116. Chew EY, Ambrosius WT, Davis MD, Danis RP, Gangaputra S, Greven CM, et al. Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2010;363(3):233-44.
117. Keech AC, Mitchell P, Summanen PA, O'Day J, Davis TM, Moffitt MS, et al. Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;370(9600):1687-97.
118. Wan Y, Cui R, Gu J, Zhang X, Xiang X, Liu C, et al. Identification of Four Oxidative Stress-Responsive MicroRNAs, miR-34a-5p, miR-1915-3p, miR-638, and miR-150-3p, in Hepatocellular Carcinoma. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:5189138.
119. Majumder S, Thieme K, Batchu SN, Alghamdi TA, Bowskill BB, Kabir MG, et al. Shifts in podocyte histone H3K27me3 regulate mouse and human glomerular disease. *J Clin Invest*. 2018;128(1):483-99.
120. Zhang X, Song S, Luo H. Regulation of podocyte lesions in diabetic nephropathy via miR-34a in the Notch signaling pathway. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(44):e5050.
121. Shang F, Wang SC, Hsu CY, Miao Y, Martin M, Yin Y, et al. MicroRNA-92a Mediates Endothelial Dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(11):3251-61.

122. Fang F, Song T, Zhang T, Cui Y, Zhang G, Xiong Q. MiR-425-5p promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells through SCAI-mediated dysregulation of multiple signaling pathways. *Oncotarget*. 2017;8(19):31745-57.
123. Zhang Z, Wen M, Guo J, Shi J, Wang Z, Tan B, et al. Clinical value of miR-425-5p detection and its association with cell proliferation and apoptosis of gastric cancer. *Pathol Res Pract*. 2017;213(8):929-37.
124. Monteiro MB, Santos-Bezerra DP, Thieme K, Admoni SN, Perez RV, Machado CG, et al. Thioredoxin interacting protein expression in the urinary sediment associates with renal function decline in type 1 diabetes. *Free Radic Res*. 2016;50(1):101-10.
125. Duan J, Du C, Shi Y, Liu D, Ma J. Thioredoxin-interacting protein deficiency ameliorates diabetic retinal angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018;94:61-70.
126. Luo Y, Yu L, Yu T, Jiang F, Cai X, Zhao Y, et al. The association of DNA methyltransferase 1 gene polymorphisms with susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Biomed Pharmacother*. 2015;73:35-9.
127. Aldemir O, Turgut F, Gokce C. The association between methylation levels of targeted genes and albuminuria in patients with early diabetic kidney disease. *Ren Fail*. 2017;39(1):597-601.