MARIA BEATRIZ CAMARGO MONTEIRO CAILLAUD

A expressão dos genes codificantes da proteína de interação com tioredoxina, da beta 2 microglobulina e do transportador de tiamina 1, correlaciona-se com marcadores clínicos da doença renal em pacientes com diabetes 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 Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Caillaud, Maria Beatriz Camargo Monteiro

A expressão dos genes codificantes da proteína de interação com tiorredoxina, da beta 2 microglobulina e do transportador de tiamina 1, correlaciona-se com marcadores clínicos da doença renal em pacientes com diabetes tipo 1 / Maria Beatriz Camargo Monteiro Caillaud. -- São Paulo, 2015.

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

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella.

Descritores: 1.Diabetes mellitus 2.Nefropatias diabéticas 3.Urina
4.Produutos finais de glicosilação 5.Tiamina 6.Tiorredoxinas 7.Microglobulina-2
beta

Dedico este trabalho à minha grande família,
a quem devo tudo o que tenho
e tudo o que sou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora, Prof^a. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella, por acreditar mais uma vez em mim e na minha capacidade para desenvolver esse projeto. Obrigada por todos os ensinamentos, que sempre foram muito além do campo científico.

As minhas queridas companheiras de bancada Karina Thieme e Daniele Pereira dos Santos. Amigas de todas as horas e de todos os experimentos. O doutorado com elas foi, sem dúvida, “mara”.

Aos queridos amigos do grupo de complicações Ricardo Perez e Sharon Admoni, pela companhia no ambulatório, pela amizade e pelas lições em como trabalhar com os pacientes.

Ao amigo Thiago Patente por estar sempre disposto a ajudar nas dúvidas sobre a análise estatística e pelas conversas infinitas no laboratório.

Aos “Malunos” Nelly Fabre, Marcos Tadashi, Gustavo Daher, Tatiana Pelaes e Juliana Zucare, por se juntaram ao time e o tornarem ainda mais forte.

As Dras. Márcia Queiroz, Márcia Nery e Maria Cândida Parisi, pelo apoio no recrutamento dos pacientes para este estudo.

As enfermeiras, residentes, preceptores e funcionários do Serviço de Endocrinologia do HC-FMUSP, pelo auxílio no encaminhamento dos pacientes e nas coletas das amostras.

A todos os amigos do LIM-10, em especial a Dra. Marisa Passarelli, pela cooperação, amizade e por formarmos esse grupo de pesquisa tão legal.

A Prof^a. Maria Oliveira de Souza, do Laboratório de Fisiologia Renal do ICB-USP, por ter me recebido em seu laboratório, ter colaborado com a cultura celular deste projeto e por ter me ensinado tanto.

Ao Prof. Ubiratan Fabres Machado e a pesquisadora Maristela Okamoto, do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia do ICB-USP, pela colaboração dentro do projeto temático.

A Prof^a. Viktoria Woronik por ter permitido a coleta de amostras dos pacientes do ambulatório do Serviço de Nefrologia do HC-FMUSP.

Ao Prof. Chin Jia Lin e a pesquisadora Nathália Gonçalves, pelo auxílio nas etapas iniciais de padronização do fracionado RNA de sedimento urinário.

A Aritânia Santos, do LIM-18, pela amizade e por ser sempre tão solícita no empréstimo dos equipamentos de seu laboratório.

A Prof^a. Mari Cleide Sogayar e ao Túlio Pereira, pela ajuda na citometria de fluxo. A Prof^a. Suely Marie e a pesquisadora Sueli Oba, pela ajuda no RNASeq, ambos experimentos tão importantes para a continuidade desse estudo no meu pós-doutorado.

Ao Prof. Vishal Vaidya, do Laboratory of Kidney Toxicology and Regeneration da Harvard Medical School, por ter me recebido em seu laboratório e ter me ensinado tantas técnicas importantes.

Ao Prof. Daniel Giannella-Neto pela ajuda na análise estatística e pelas sugestões sempre bem colocadas na elaboração dos artigos científicos.

A Ana Mercedes Cavaleiro pela ajuda em todos os projetos e por ter sempre uma dica infalível de como melhorar os protocolos experimentais.

A Maria Auxiliadora por cuidar do nosso banco de DNA com tanta competência.

A secretária Norisa Herrera, pela ajuda nos assuntos administrativos e nas prestações de conta da FAPESP.

A toda a equipe do LIM-25, em especial aos alunos e técnicos do grupo de diabetes.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

A minha grande família: meus pais Maria Cristina e Reinaldo, por me apoiarem sempre e me incentivarem a continuar na pesquisa; meu marido Maxence, meu companheiro de todas as horas, na alegria (muitas) e na tristeza (poucas, ainda bem!); minhas irmãs Maria Carolina, Maria Célia e Maria Cláudia, minhas amigas, minhas parceiras; e meus cunhados Pedro Henrique, Rafael e Luiz Fernando. Juntos nós fazemos a festa!

A todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *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 Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 A evolução da nefropatia diabética.....	3
1.2 A tubulopatia diabética	6
1.3 Os AGEs e a lesão túbulo-intersticial na nefropatia diabética	7
1.4 O sistema tiorredoxina e a nefropatia diabética.....	8
1.5 Aumento do clearance renal de tiamina na nefropatia diabética	11
1.6 A beta 2 microglobulina e a nefropatia diabética	14
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Extração do RNA do sedimento urinário.....	20
3.2 Extração do RNA das células linfomononucleares	21
3.3 Expressão do mRNA dos genes TXNIP, TXN, SLC19A2, SLC19A3, B2M, SLC5A2 e NPHS2 no sedimento urinário por qPCR.....	22
3.4 Expressão do mRNA dos genes TXNIP, TXN, SCL19A2 e B2M nas células linfomononucleares por qPCR	25
3.5 Avaliação da concentração de tiamina plasmática em sangue total.....	27
3.6 Cultura de linhagem de células epiteliais renais humanas	27
3.7 Tratamentos das células HEK293 com glicose e albumina glicada.....	28
3.8 Extração de RNA das células HEK293.....	29

4.	RESULTADOS	31
4.1	Ensaio de expressão do mRNA no sedimento urinário.....	32
4.2	Ensaio de expressão do mRNA em células linfomononucleares.....	53
4.3	Concentração plasmática de tiamina em pacientes com DM1	58
4.4	Ensaio de expressão do mRNA em células embrionárias renais humanas tratadas com glicose e albumina glicada	61
5.	DISCUSSÃO	65
6.	CONCLUSÕES	79
7.	REFERÊNCIAS.....	81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTB – Gene codificante da beta actina

AGE - Produtos finais de glicação avançada (*advanced glycation end-products*)

AGER – Gene codificante do RAGE

AMPK - Proteína cinase ativada por AMP

Alb AGE – Albumina glicada

Alb Ctrl – Albumina controle não glicada

BRA – Bloqueador do receptor de angiotensina II

B2M – Gene codificante da beta 2 microglobulina

CKD-EPI - *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*

Ct – *Cycle threshold*

cDNA – DNA complementar

gDNA – DNA genômico

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DM1 – Diabetes mellitus tipo 1

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

DRC – Doença renal crônica

EUA – Excreção urinária de albumina

ELF1 – Fator semelhante a E74 1 (Fator de transcrição de domínio ETs)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs – Espécies reativas de oxigênio

F6F – Frutose 6 fostato

G3P – Gliceraldeído 3 fosfato

GAPDH – Gene codificante da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GESF – Glomeruloesclerose segmentar focal

GSH – Glutationa reduzida

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

HbA1c – Hemoglobina glicada

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HPRT1 – Gene codificante da hipoxantina fostoribosiltransferase 1

IECA – Inibidor da enzima conversora de angiotensina

IGF1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL - Interleucina

MCP1 – Proteína quimiotática de monócitos 1

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

NADPH – Nicotinamida adenina difosfato

NALP3 – Proteína 3 contendo domínios NACHT, LRR e PYD

ND – Nefropatia diabética

NO – Óxido nítrico

NFkB - Fator nuclear kappa B

NPHS2 – Nefrose 2 resistente a esteróide idiopático (gene codificante da podocina)

O₂ – Radical superóxido

OH· – Radical hidroxil

PAI1 - Inibidor do ativador do plasminogênio 1

PBS – Tampão fosfato salino

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PGK1 – Gene codificante da fosfoglicerato cinase 1

PKC – Proteína cinase C

PPIA – Peptidilprolil isomerase A (gene codificante da ciclofilina A)

PTEC – Célula tubular proximal

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

mRNA – RNA mensageiro

RAGE – Receptor para produtos finais de glicação avançada

ROC - *Receiver operator characteristic*

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa

SGLT2 – Cotransportador sódio-glicose membro 2

SLC5A2- Família carreadores de solutos 5, membro 2 (gene codificante do SGLT2)

SLC19A2 – Família carreadores de solutos 19, membro 2 (gene codificante do THTR1)

SLC19A3 – Família carreadores de solutos 19, membro 3 (gene codificante do THTR2)

TXNDC2 – Tiorredoxina espermatozóide específica

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TFG – Taxa de filtração glomerular

TFGe – Taxa de filtração glomerular estimada

TG - Triglicérides

TGFβ - Fator de crescimento transformante beta

THTR1 – Transportador de tiamina do tipo 1

THTR2 - Transportador de tiamina do tipo 2

TNF- α - Factor de necrose tumoral- α

TPP – Pirofosfato de tiamina

TXN – Tiorredoxina

TXNIP - Proteína de interação com a tiorredoxina (*Thioredoxin interacting protein*)

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da via da tiorredoxina. TXN1; tiorredoxina 1; TXN2: tiorredoxina 2; TXNIP: proteína de interação com a tiorredoxina. Adaptado de Maulik, N; Das, DK (30).....	9
Figura 2 - Diagrama esquemático da permeabilidade da tiamina através do epitélio tubular renal. Adaptado de Larkin JR et al. (2012) Plos one 7(12):e53175 (45).....	12
Figura 3 – Representação esquemática da placa <i>TaqMan® Array Human Endogenous Controls</i> contendo 32 genes endógenos em triplicata.....	23
Figura 4 - <i>Ranking</i> de estabilidade, conforme avaliado pelo <i>Genorm</i> , para cada um dos genes endógenos testados no sedimento urinário – os menores valores correspondem aos genes mais estáveis nos grupos testados.	32
Figura 5 - Expressão relativa do gene que codifica o SGLT2 (<i>SLC5A2/ELF1</i>) em sedimento urinário de indivíduos controles, portadores de diabetes tipo 1 (DM1) e de glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.	36
Figura 6 - Expressão relativa do gene que codifica o SGLT2 (<i>SLC5A2/ELF1</i>) em sedimento urinário de portadores de DM1 com ausência e presença de nefropatia diabética. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.	37
Figura 7 - Expressão relativa do gene que codifica o SGLT2 (<i>SLC5A2/ELF1</i>) em sedimento urinário de portadores de DM1 de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.....	37
Figura 8 - Expressão relativa do gene que codifica a podocina (<i>NPHS2/ELF1</i>) em sedimento urinário de indivíduos controles, de portadores de DM1 e de glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.	38
Figura 9 - Expressão relativa do gene que codifica a podocina (<i>NPHS2/ELF1</i>) em sedimento urinário de pacientes DM1 com ausência e presença de nefropatia diabética. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.	39
Figura 10 - Expressão relativa do gene que codifica a TXNIP (<i>TXNIP/ELF1</i>) em sedimento urinário de indivíduos controle, de portadores de DM1 e de glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.	40

Figura 11 - Expressão relativa do gene que codifica a TXNIP (*TXNIP/ELF1*) em sedimento urinário de pacientes DM1 com ausência e presença de nefropatia diabética. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos. ... 41

Figura 12 - Expressão relativa do gene que codifica a TXNIP (*TXNIP/ELF1*) em sedimento urinário de portadores de DM1 de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos. 41

Figura 13 – Expressão do gene que codifica a TXNIP (*TXNIP/ELF1*) no sedimento urinário de pacientes DM1 classificados de acordo com a perda da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). Não-declinantes e declinantes perderam, respectivamente, <5 e ≥ 5 mL/min/1,73 m². Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos. 43

Figura 14 - Expressão relativa do gene que codifica a TXN (*TXN/ELF1*) em sedimento urinário de indivíduos controle e de portadores de DM1 e de glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos. 44

Figura 15 - Expressão relativa do gene que codifica a TXN (*TXN/ELF1*) em sedimento urinário de pacientes DM1 de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos. 44

Figura 16 - Expressão relativa do gene que codifica o transportador de tiamina tipo 1 (*SLC19A2/ELF1*) no sedimento urinário de indivíduos controle e de portadores de DM1 e de glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos. 45

Figura 17 - Expressão relativa do gene que codifica o transportador de tiamina tipo 1 (*SLC19A2/ELF1*) no sedimento urinário de pacientes DM1 com presença e ausência de nefropatia diabética. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos..... 46

Figura 18 - Expressão relativa do gene que codifica o transportador de tiamina tipo 1 (*SLC19A2/ELF1*) em sedimento urinário de pacientes DM1 de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos. 46

Figura 19 - Expressão relativa do gene que codifica a beta 2 microglobulina (*B2M/ELF1*) em sedimento urinário de indivíduos controles e de portadores de DM1 e de glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos. 49

Figura 20 - Expressão relativa do gene que codifica a beta 2 microglobulina (*B2M/ELF1*) em sedimento urinário de pacientes DM1 com presença e ausência de nefropatia diabética. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos..... 49

Figura 21 - Expressão relativa do gene que codifica a beta 2 microglobulina (*B2M/ELF1*) em sedimento urinário de pacientes DM1 de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos..... 50

Figura 22 - Expressão relativa do gene que codifica a beta 2 microglobulina (*B2M/ELF1*) em sedimento urinário de pacientes DM1 de acordo com a presença e ausência de nefropatia diabética (ND) nos participantes com taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) ≥ 60 ml/min/1,73 m². Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos. 53

Figura 23 - Estabilidade dos genes *B2M*, *ACTB* e *HPTR1* obtida pelo programa *Genorm* a partir dos resultados de expressão gênica de um experimento piloto em seis pacientes DM1 e em três indivíduos controles..... 54

Figura 24 - Expressão relativa do gene que codifica a TXNIP (*TXNIP/ACTB*) em células linfomononucleares de indivíduos controle e de portadores de DM1. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos..... 55

Figura 25 - Expressão relativa do gene que codifica a TXN (*TXN/ACTB*) em células linfomononucleares de indivíduos controle e de portadores de DM1. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos..... 56

Figura 26 - Correlação positiva entre expressões de *TXNIP* e *TXN* em células linfomononucleares de pacientes DM1. $r =$ coeficiente de correlação de Spearman..... 57

Figura 27 - Expressão relativa do gene que codifica o transportador de tiamina 1 (*SLC19A2/ACTB*) em células linfomononucleares de indivíduos controle e de portadores de DM1. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos. 57

Figura 28 - Expressão relativa do gene que codifica a beta 2 microglobulina (*B2M/ACTB*) em células linfomononucleares de indivíduos controle e de portadores de DM1. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos. 58

Figura 29 - Concentrações plasmáticas de tiamina de indivíduos controle e de portadores de DM1. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos. 60

Figura 30 - Concentrações plasmáticas de tiamina de indivíduos controle e de portadores de DM1 classificados em nefropatia diabética (ND) ausente, incipiente e instalada. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos. 60

Figura 31 - Expressão relativa do gene que codifica a TXNIP (*TXNIP/18S*) em células HEK293 tratadas por 72 horas com: 5,6 mM glicose (C); 25 mM de glicose (25mM Gli), 25 mM de glicose + 1 mg/mL albumina controle (25mM Gli

+ Alb Ctrl) e 25 mM de glicose + 1 mg/mL de albumina AGE (25mM Gli + Alb AGE). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos. 61

Figura 32- Expressão relativa do gene que codifica o transportador de tiamina 1 (*SLC19A2/18S*) em células HEK293 tratadas por 72 horas com: 5,6 mM glicose (C); 25 mM de glicose (25mM Gli), 25 mM de glicose + 1 mg/mL albumina controle (25mM Gli + Alb Ctrl) e 25 mM de glicose + 1 mg/mL de albumina AGE (25mM Gli + Alb AGE). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos. 62

Figura 33 - Expressão relativa do gene que codifica a B2M (*B2M/18S*) em células HEK293 tratadas por 72 horas com: 5,6 mM glicose (C); 25 mM de glicose (25mM Gli), 25 mM de glicose + 1 mg/mL de albumina controle (25mM Gli + Alb Ctrl) e 25 mM de glicose + 1 mg/mL de albumina AGE (25mM Gli + Alb AGE). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e laboratoriais dos portadores de DM1 de acordo com os graus de nefropatia diabética (ND) e da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe)	35
Tabela 2 - Concentrações de tiamina plasmática em pacientes com diferentes graus de nefropatia diabética.	59
Tabela 3 – Resumo dos resultados encontrados nos experimentos de avaliação da expressão dos genes-alvo tanto nos portadores de DM1 quanto nas células HEK 293.	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Correlação entre a expressão do gene que codifica a podocina (<i>NPHS2/ELF1</i>) e a excreção urinária de albumina (mg/g) nos pacientes DM1. r = coeficiente de correlação de Spearman.	39
Gráfico 2- Correlação entre a expressão do mRNA de <i>TXNIP/ELF1</i> e a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) em (A) pacientes DM1; (B) pacientes DM1 do sexo feminino; e (C) pacientes DM1 do sexo masculino. r = coeficiente de correlação de Spearman.	42
Gráfico 3 - Correlação entre a expressão do gene que codifica o transportador de tiamina tipo 1 (<i>SLC19A2/ELF1</i>) e a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) nos pacientes DM1. r = coeficiente de correlação de Spearman.	47
Gráfico 4 - Correlação entre a expressão do gene que codifica o transportador de tiamina tipo 1 (<i>SLC19A2/ELF1</i>) e a creatinina plasmática nos pacientes DM1. r = coeficiente de correlação de Spearman.	48
Gráfico 5 – Correlação entre a expressão do gene que codifica a beta 2 microglobulina (<i>B2M/ELF1</i>) no sedimento urinário e a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) em (A) pacientes DM1; (B) pacientes DM1 do sexo feminino; e (C) pacientes DM1 do sexo masculino. r = coeficiente de correlação de Spearman.	51
Gráfico 6 - Correlação entre a expressão do gene que codifica a β 2-microglobulina (<i>B2M/ELF1</i>) no sedimento urinário de portadores de DM1 e a creatinina plasmática. r = coeficiente de correlação de Spearman.	52

RESUMO

Caillaud, MBCM. *A expressão dos genes codificantes da proteína de interação com tiorredoxina, da beta 2 microglobulina e do transportador de tiamina 1, correlaciona-se com marcadores clínicos da doença renal em pacientes com diabetes tipo 1* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A nefropatia diabética (ND) é uma das principais causas de doença renal terminal. Além da lesão glomerular, o compartimento tubulointersticial é afetado no desenvolvimento da ND, não somente pela proteinúria como pelos efeitos pró-inflamatórios, profibróticos, pró-oxidantes e angiogênicos da hiperglicemia e dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Sabe-se que as concentrações de marcadores do estresse oxidativo estão aumentadas em pacientes com diabetes mellitus (DM). O sistema tiorredoxina (TXN) é um dos principais sistemas antioxidantes endógenos. A TXN é capaz de interagir com um grande número de fatores de transcrição e proteínas, tal como a *Thioredoxin interacting protein* (TXNIP) que tem sido reconhecida na patogênese do DM e de suas complicações. Além da TXNIP, a deficiência de tiamina, ou vitamina B1, já foi relatada em modelos experimentais de DM, concomitantemente a um aumento de seu *clearance* renal. Os transportadores de tiamina 1 (THTR1) e 2 (THTR2) (codificados pelos genes *SLC19A2* e *SLC19A3*, respectivamente) são os responsáveis pela reabsorção de tiamina no túbulo proximal após sua filtração pelo glomérulo. Estudos já demonstraram que a excreção aumentada de tiamina pode ser um fator de risco para o declínio precoce da função renal em pacientes DM. Uma outra proteína de interesse é a beta 2 microglobulina (B2M), expressa em situações que cursam com inflamação, um fenômeno bem caracterizado na tubulopatia diabética. O estudo da ativação intrarenal de vias potencialmente associadas à evolução da ND em humanos é dificultada pela necessidade de biópsia renal. Recentemente o sedimento urinário tem sido utilizado na avaliação das doenças renais, tanto na tentativa de identificar biomarcadores que possam predizer o declínio da função renal, como para o melhor entendimento da patogênese dessa complicação. O objetivo deste trabalho foi estudar a participação dos genes-alvo *TXNIP*, *TXN*, *SLC19A2*, *SLC19A3* e *B2M* na patogênese da ND em portadores de DM1. Estudamos o RNA mensageiro (mRNA) do sedimento urinário de pacientes DM1 (n=55), portadores de glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF, um modelo de nefropatia não diabética, n=12) e de indivíduos controles (n=11) para avaliação da expressão dos genes-alvo, e sua associação com as manifestações da ND. Também foi extraído mRNA de células linfomononucleares de pacientes DM1 (n=162) e indivíduos controles (n=26) para comparação com os resultados obtidos no sedimento urinário e foram dosadas as concentrações plasmáticas de tiamina em um subgrupos de pacientes DM1 e de indivíduos controles. Além disso, uma linhagem de células renais humanas foi tratada com altas concentrações de glicose e albumina glicada ou não glicada *in vitro* para avaliar se os AGEs estão implicados na alteração de expressão dos genes-alvos. Como resultado observamos (1) um aumento na expressão de *TXNIP* e *TXN* no

sedimento urinário de pacientes DM1 com doença renal e associação da expressão de *TXNIP* com a magnitude do declínio da taxa de filtração glomerular; (2) um aumento na expressão de *TXNIP* e *TXN* nas células linfomononucleares dos pacientes DM1; (3) um aumento na expressão de *SLC19A2* no sedimento urinário de pacientes DM1 com doença renal; (4) uma diminuição nas concentrações plasmáticas de tiamina nos pacientes DM1 em comparação aos controles; (5) um aumento na expressão de *B2M* no sedimento urinário de pacientes DM1 com doença renal e (6) um aumento na expressão de *TXNIP* e *B2M* nas células renais humanas tratadas concomitantemente com altas concentrações de glicose e albumina glicada. Os resultados do presente estudo sugerem fortemente a participação do sistema TXN e da *B2M* na etiopatogênese da ND.

Descritores: diabetes mellitus, nefropatias diabéticas, urina, produtos finais de glicosilação, tiamina, tiorredoxinas, microglobulina-2 beta

ABSTRACT

Caillaud, MBCM. *The expression of the genes encoding thioredoxin interacting protein, beta 2 microglobulin and thiamine transporter 1, correlates with clinical markers of renal disease in type 1 diabetes patients* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Diabetic nephropathy (DN) is a major cause of end stage renal disease. Glomerular and tubulointerstitial compartments are affected not only by proteinuria but also by the pro-inflammatory, profibrotic, pro-oxidants and pro-angiogenic effects exerted by hyperglycemia and advanced glycation end products (AGEs) in the development of DN. It is well known that concentrations of oxidative stress markers are increased in patients with diabetes mellitus (DM). The thioredoxin system (TXN) is one of the majors endogenous antioxidant systems; TXN molecule is able to interact with a large number of transcription factors and proteins such as Thioredoxin interacting protein (TXNIP), which has been recognized in the pathogenesis of DM and its complications. Deficiency of thiamine, or B1 vitamin, has been reported in experimental models of DM concomitantly with an increase in its renal clearance. Thiamine transporter 1 (THTR1), encoded by the *SLC19A2* gene and Thiamine transporter 2 (THTR2), encoded by the *SLC19A3* gene are responsible for thiamine reabsorption in the proximal tubule after glomerular filtration. Studies have shown that increased urinary excretion of thiamine may be a risk predictor for an early decline in kidney function in diabetic patients. Another protein of interest is beta-2-microglobulin (B2M), expressed in situations of inflammation, a well-characterized phenomenon in diabetic tubulopathy. The study of activation or inactivation of intrarenal pathways potentially associated with progression of DN in humans is complicated by the need for renal biopsy. Recently urinary sediment has been used in the evaluation of kidney diseases in an attempt to identify biomarkers that can predict kidney function decline and as a tool for a better understanding of the pathogenesis of this complication. The objective of this work was to study the participation of the target genes *TXNIP*, *TXN*, *SLC19A2*, *SLC19A3* and *B2M* in the pathogenesis of DN in type 1 DM (T1D) patients. We studied the urinary sediment messenger RNA (mRNA) from patients with T1D (n=55); with focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS, a non diabetic nephropathy model, n=12) and from control subjects (n=11) to assess the expression of the target genes and their association with the severity of DN. We also studied the mRNA expression of peripheral lymphomononuclear (PLMN) cells from T1D patients (n=162) and control subjects (n=26) in order to compare with the results obtained in the urinary sediment. Plasmatic concentrations of thiamine were also measured in a subgroup of T1D patients and control subjects. In addition, a lineage of human kidney cells was exposed to high glucose concentrations and to glycated and non-glycated albumin to evaluate if AGEs are implicated in the modulation of expression of the target genes. As a result we found that (1) *TXNIP* and *TXN* are upregulated in the urinary sediment of T1D patients with kidney disease and *TXNIP* is associated with the magnitude of glomerular

filtration rate decline; (2) *TXNIP* and *TXN* are upregulated in PLMN cells from T1D patients; (3) *SLC19A2* is upregulated in the urinary sediment of T1D patients with kidney disease; (4) T1D patients present decreased plasmatic thiamine concentrations compared to control subjects; (5) *B2M* is upregulated in the urinary sediment of T1D patients with kidney disease and (6) *TXNIP* and *B2M* are upregulated in human kidney cells exposed concomitantly to high glucose concentrations and glycated albumin. The results of the present study strongly suggest the participation of the TXN system and of B2M in the pathogenesis of DN.

Descriptors: diabetes mellitus, diabetic nephropathies, urine, glycosylation end products, advanced, thiamine, thioredoxins, beta 2-microglobulin

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus do tipo 1 (DM1) corresponde a, aproximadamente, 10% de todos os casos de diabetes no mundo (1). Estima-se um acometimento de cerca de 30 milhões de indivíduos, sendo considerado a endocrinopatia mais comum da infância e adolescência (1). Nas últimas décadas, sua incidência vem aumentando na maioria das regiões do mundo (2) estando associada a um aumento significativo do risco de complicações crônicas microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia diabéticas) e cardiovasculares (3).

Vários mecanismos são propostos para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia, resultando no surgimento das complicações microvasculares. Os principais são apresentados resumidamente a seguir:

a. Aumento da ativação da via dos polióis – devido ao aumento da glicose intracelular, esta é convertida à sorbitol pela ação da enzima aldose redutase. A redução da glicose a sorbitol consome nicotinamida adenina difosfato (NADPH), que é necessária para a regeneração de glutathione reduzida (GSH) pela enzima glutathione redutase, induzindo, ou mesmo exacerbando, o estresse oxidativo intracelular.

b. Aumento da formação dos AGEs – produtos que resultam da reação não enzimática do grupo aldeído reativo da glicose com o grupo amino das proteínas. Inicialmente formam-se os produtos de Amadori, dos quais o mais conhecido é a hemoglobina glicada (HbA_{1c}). Outras reações ocorrem a partir deste ponto para produzir um grupo de compostos denominados produtos finais de glicação avançada (*advanced glycation*

end-products, AGEs). Os AGEs também se formam a partir de precursores dicarbonil derivados da autooxidação intracelular da glicose e da fragmentação do gliceraldeído 3 fosfato (G3P). Esses precursores dicarbonil intracelulares reagem com o grupamento amino de proteínas intra e extracelulares para formar os AGEs.

c. Aumento da ativação da proteína cinase C (PKC) - a ativação da PKC resulta em diminuição da produção de óxido nítrico (NO); aumento da atividade da endotelina 1; alteração na expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF); do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e do inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI1); e ainda ativação do Fator nuclear kappa B (NF- κ B) e do sistema Nicotinamida adenina difosfato (NADPH) oxidase.

d. Aumento da ativação da via da hexosamina – devido a um desvio da glicose intracelular em excesso para a via da hexosamina, onde é convertida à frutose 6 fosfato (F6F). A F6F é transformada em N-acetil glicosamina-6-fosfato e, posteriormente, em N-acetilglicosamina 1,6-fosfato, e à UDP-N-acetilglicosamina. Esta última é substrato para glicosilação de proteínas intracelulares, alterando suas funções. Por essa via pode haver, por exemplo, alterações em fatores de transcrição que podem modificar a expressão gênica.

O estresse oxidativo é considerado o elemento unificador de todas essas vias bioquímicas deletérias, na instalação das complicações diabéticas (4); ele se estabelece quando as defesas intracelulares anti-oxidantes são insuficientes para detoxificar um conjunto de moléculas

denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs), e/ou quando há produção excessiva de EROs. Durante o metabolismo normal, as EROs são formadas quando o oxigênio é reduzido à água e, neste processo, formam-se produtos intermediários: o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH^\cdot$).

Há evidências de que as concentrações de marcadores do estresse oxidativo estão aumentadas em pacientes com DM, inclusive crianças e adolescentes portadores de DM1 (5, 6). Além da produção aumentada de EROs, alguns estudos em pacientes com DM e complicações microvasculares também demonstraram diminuição nas defesas antioxidantes (7, 8).

1.1 A evolução da nefropatia diabética

A doença renal crônica (DRC) do diabetes, ou nefropatia diabética (ND) é atualmente a causa mais comum de falência renal no mundo ocidental (9). Esta complicação é classicamente dividida em cinco estágios. O primeiro deles é caracterizado por hiperfiltração glomerular, que está presente em um terço dos portadores de DM1 ao diagnóstico. Ainda há controvérsias sobre a participação da hiperfiltração na susceptibilidade de um paciente à lesão renal induzida por hiperglicemia (10, 11).

O segundo estágio, caracterizado pela excreção urinária de albumina (EUA) normal, consiste no espessamento da membrana basal glomerular e no aumento da matriz mesangial, que se tornam mais

proeminentes após 3,5 a 5 anos de doença. O terceiro estágio, denominado de ND incipiente, caracteriza-se pela presença de microalbuminúria persistente (EUA 30 – 299 mg/g de creatinina).

O quarto estágio, denominado ND franca, caracteriza-se por proteinúria, queda da taxa de filtração glomerular (TFG) e hipertensão arterial sistêmica e, usualmente, ocorre entre 15 a 20 anos após o início do DM1. O quinto estágio, denominado de doença renal terminal, ocorre após 20 a 30 anos de doença e acomete aproximadamente 30 a 40% dos pacientes (10).

A ND é, de forma geral, de ocorrência comum nos indivíduos portadores de DM1. Fatores adquiridos e genéticos são mencionados para explicar o desenvolvimento da ND (12), que é caracterizada, portanto, pela hipertrofia renal e glomerular, proteinúria persistente, progressivo declínio da TFG e hipertensão (13).

A microalbuminúria era tradicionalmente considerada um marcador de risco preditivo para os estágios avançados de DRC. Estudos mais recentes, no entanto, demonstraram que a microalbuminúria é um processo dinâmico que apresenta maior probabilidade de remitir para normoalbuminúria do que de progredir para proteinúria. A incidência cumulativa de remissão em seis anos é da ordem de 50%, maior que o risco de progressão para proteinúria, que varia de 15 a 25% em alguns estudos epidemiológicos (14).

Os conceitos de que a microalbuminúria sempre precede a queda da TFG e de que todos os pacientes com doença renal terminal

desenvolvem previamente proteinúria têm sido questionados e vários estudos têm avaliado melhor a relação temporal entre o início da perda da função renal e a EUA.

No *Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study*, quase 10% dos pacientes já apresentavam franca diminuição da TFG ao início da microalbuminúria, indicando que o declínio da função renal pode preceder a microalbuminúria (15). Uma coorte de portadores de DM1 normoalbuminúricos do *First Joslin Kidney Study on the Natural History of Microalbuminuria in Type 1 Diabetes* foi seguida até o início da microalbuminúria. Setenta e nove participantes que desenvolveram microalbuminúria nos primeiros quatro anos de seguimento foram acompanhados por 12 anos para caracterizar as alterações longitudinais da EUA e da TFG; 29% desses pacientes apresentaram TFG <60 mL/min e quase metade deles nunca desenvolveu proteinúria. Com base nesses resultados, Perkins e Krolewski propõem um novo modelo de ND que considera que: (1) o início da microalbuminúria é um processo dinâmico no qual a remissão é a evolução mais comum; (2) o declínio precoce da função renal se inicia tão precocemente quanto a microalbuminúria em 30% dos pacientes; (3) o declínio precoce da função renal é um processo linear progressivo que leva à diminuição da função renal em um subgrupo de pacientes, independentemente da evolução da EUA. Embora não esteja estabelecido se a microalbuminúria causa o declínio precoce da função renal, o início do processo certamente não depende de proteinúria. Assim, esses autores levantam a possibilidade de que a EUA e o declínio precoce

da função renal representem fenótipos paralelos que têm em comum os mesmos mecanismos etiológicos (14).

Na casuística de 434 portadores de DM1 que compunham o banco de DNA para o estudo da predisposição às complicações crônicas do diabetes acompanhados em diferentes serviços da região sudeste e sul do Brasil, 14,9% dos pacientes com normoalbuminúria e 17% dos pacientes com microalbuminúria apresentaram TFG <60 mL/min/1,73 m², o que corrobora a dissociação entre o *status* de albuminúria e a TFG em uma parcela significativa de portadores de DM1.

1.2 A tubulopatia diabética

A glomerulopatia diabética típica está presente em apenas um terço dos portadores de DM2 com microalbuminúria e um terço dos pacientes apresenta ausência de alterações glomerulares, mas expressivo comprometimento túbulo-intersticial (16). Além disso, em pacientes com DRC, a extensão da disfunção renal correlaciona-se melhor com a lesão túbulo-intersticial do que com as alterações na morfologia glomerular (17). Esses achados sugerem que a doença renal diabética é apenas parcialmente explicada pela glomerulopatia.

A relação entre a lesão glomerular e a túbulo-intersticial parece ser mediada pela proteinúria, uma vez que a gravidade da lesão túbulo-intersticial correlaciona-se com a magnitude da proteinúria (18) e que estudos *in vitro* demonstraram que algumas proteínas séricas, tais como

albumina, transferrina e imunoglobulinas, podem ativar a secreção de mediadores inflamatórios pelas células epiteliais proximais tubulares, conhecidas como PTEC (19).

1.3 Os AGEs e a lesão túbulo-intersticial na nefropatia diabética

O aumento da produção dos AGEs é um mecanismo que sabidamente participa da lesão microvascular causada pela exposição celular à hiperglicemia crônica (20). Um dos receptores para AGEs, denominado RAGE (codificado pelo gene *AGER*) atua como um transdutor de sinal e a interação RAGE-AGE ativa múltiplas vias de sinalização intracelulares que aumentam a produção de fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e estresse oxidativo (21).

Como exemplo, estudos demonstraram que os AGEs induzem apoptose, expressão de VEGF e aumento da produção da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1) em células mesangiais humanas em cultura. O aumento de MCP1, associado a infiltração de monócitos nessas células, foi observado nas fases iniciais da ND (22). As células mesangiais ocupam uma posição anatômica central no glomérulo, tendo papel crucial na manutenção da estrutura e função dos tufo capilares (23, 24). A MCP1 plasmática também foi positivamente correlacionada com EUA em pacientes DM1 (25).

Os AGEs também estão relacionados ao estímulo da produção do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1), do fator de crescimento

derivado de plaquetas (PDGF) e do TGF- β em células mesangiais que, por sua vez, produzem colágeno do tipo 4, laminina e fibronectina (24, 26, 27). Os AGEs também são capazes de induzir a expressão de TGF- β em podócitos e células tubulares proximais (24, 27).

1.4 O sistema tiorredoxina e a nefropatia diabética

Os mecanismos pelos quais a hiperglicemia exerce danos celulares já foram explicados acima. Sendo o estresse oxidativo considerado o elemento unificador de todas essas vias na instalação das complicações diabéticas (28), os sistemas enzimáticos e não-enzimáticos de defesa celular contra o estresse oxidativo têm fundamental importância.

O sistema tiorredoxina é composto pela tiorredoxina (TXN), pelas enzimas TXN redutases e pela NADPH. Juntamente com o sistema GSH, o sistema TXN é considerado um dos dois principais sistemas antioxidantes redutores de tiol e ambos têm expressão ubíqua (29).

O sistema TXN promove a redução de grupos cisteína oxidados em proteínas, por meio da interação com o centro redox ativo da TXN e formação de um dissulfeto, na presença da TXN peroxidase. A TXN oxidada resultante dessa reação é então reduzida pela TXN redutase e pelo NADPH. Existem três formas distintas de TXN, codificadas por genes distintos: a TXN clássica ou citosólica (TXN1), a isoforma mitocondrial (TXN2) e a isoforma TXNDC2, altamente expressa nos espermatozoides. Alterações deste sistema estão implicadas em diversas doenças humanas, inclusive no DM

(30). A Figura 1 apresenta de forma esquemática e simplificada o sistema TXN.

Figura 1- Representação esquemática da via da tioredoxina. TXN1; tioredoxina 1; TXN2: tioredoxina 2; TXNIP: proteína de interação com a tioredoxina. Adaptado de Maulik, N; Das, DK (30).

A TXN é capaz de interagir com um grande número de fatores de transcrição e proteínas; dentre essas, algumas são especialmente importantes na modulação dos efeitos biológicos da TXN, tal como a proteína de interação com a TXN (*thiredoxin interacting protein*; TXNIP) (31). A TXNIP pode ligar-se ao sítio catalítico da TXN reduzida, inibindo sua atividade e funcionando, assim, como um inibidor endógeno da TXN (32).

Recentemente, a participação da TXNIP tem sido reconhecida na patogênese do DM e de suas complicações. Parikh et al. relataram um aumento na expressão da TXNIP na musculatura esquelética de pacientes com DM2 em comparação a controles não diabéticos. A ausência de alterações no gene que codifica a TXNIP sugere que este achado seja adquirido e não herdado. Experimentos em miócitos humanos demonstraram que a exposição à glicose aumentou a expressão da TXNIP, enquanto a insulina a suprimiu. Além disso, a superexpressão de TXNIP em adipócitos diminuiu a captação celular de glicose, enquanto o silenciamento do gene *TXNIP* aumentou a captação de glicose em miócitos e adipócitos.

Os autores sugerem que a TXNIP funcione como um “interruptor” homeostático que integra a sensibilidade à glicose e a sinalização insulínica, para controlar o *status* energético celular: a insulina suprime a TXNIP no estado pós-prandial para aumentar a captação periférica de glicose. No entanto, um excesso de glicose intracelular ativa a TXNIP para cessar a captação de glicose e assim, prevenir seu metabolismo excessivo (33).

A TXNIP também tem sido considerada o elo de ligação entre a glicotoxicidade e a apoptose das células β produtoras de insulina no DM2 (34): a hiperglicemia gera EROs, o que induz a dissociação da TXNIP da TXN. A TXNIP livre liga-se ao inflamassomo NALP3 (proteína 3 contendo domínios NACHT, LRR e PYD), um complexo multiprotéico que contém caspase 1, que é ativada e processa a pró-interleucina 1 β em interleucina 1 β madura, capaz de induzir apoptose das células β (35).

A participação da TXNIP no desenvolvimento da ND tem sido estudada desde 2003, quando esse gene foi identificado como sendo estimulado por altas concentrações de glicose e capaz de promover acúmulo de colágeno tipo IV em células mesangiais humanas em cultura (36). A seguir, demonstrou-se o aumento da expressão da TXNIP em uma linhagem humana de células tubulares proximais expostas a altas concentrações de glicose (37), bem como em rins de ratos e pacientes com DM, que apresentavam expressão maior de TXNIP em comparação aos rins controles. Ao contrário, a expressão da TXN não diferiu entre diabéticos e não diabéticos. *In vitro*, altas concentrações de glicose aumentaram a expressão da TXNIP em células mesangiais e tubulares proximais e distais,

enquanto o silenciamento do gene *TXNIP* reduziu o estresse oxidativo e a produção de colágeno. Esses dados indicam que esta proteína exerce um papel importante na progressão da ND, aumentando o estresse oxidativo e a produção de matriz extracelular (38).

1.5 Aumento do *clearance* renal de tiamina na nefropatia diabética

A tiamina, ou vitamina B1, é uma vitamina hidrossolúvel essencial para a função dos neurônios e para o metabolismo dos carboidratos; o pirofosfato de tiamina (TPP) produzido a partir da fosforilação da tiamina é o principal cofator das enzimas piruvato desidrogenase, α -cetoglutarato desidrogenase e transcetolase (39).

A deficiência de tiamina já foi relatada em modelos experimentais de DM, concomitantemente a um *clearance* renal da tiamina aumentado em oito vezes (40). A deficiência de tiamina também já foi documentada em portadores de DM. Haugen encontrou uma redução de 27% nas concentrações plasmáticas de tiamina em pacientes com DM1 (41) e em um estudo japonês, 76% dos pacientes diabéticos (sete com DM1 e 39 com DM2) apresentaram concentrações plasmáticas de tiamina menores que o limite inferior da normalidade (50 ng/mL) (42).

No Reino Unido, um estudo que comparou o *status* tiamínico de portadores de DM (26 com DM1 e 48 com DM2) ao de controles saudáveis evidenciou uma redução de 75% na tiamina plasmática na população com DM. O *clearance* renal de tiamina estava significativamente aumentado em

ambos os grupos: 24 vezes nos pacientes com DM1 e 16 vezes nos pacientes com DM2, assim como a excreção fracional de tiamina. As concentrações plasmáticas de tiamina correlacionaram-se inversamente com o *clearance* e com a excreção fracional de tiamina (43).

A tiamina é um cátion que cruza a barreira celular em concentrações fisiológicas. No túbulo proximal sua reabsorção é feita pelo transportador de tiamina 1 (THTR1, codificado pelo gene *SLC19A2*) e o transportador de tiamina 2 (THTR2, codificado pelo gene *SLC19A3*). Após ser filtrada pelo glomérulo renal, a tiamina é reabsorvida do filtrado glomerular por seus transportadores localizados na membrana apical tubular e esse influxo é aumentado pelo gradiente de hidrogênio (44) (Figura 2).

Figura 2 - Diagrama esquemático da permeabilidade da tiamina através do epitélio tubular renal. Adaptado de Larkin JR et al. (2012) Plos one 7(12):e53175 (45)

A expressão dos genes que codificam o THTR1 e THTR2 é regulada pelo fator de transcrição Sp1 (46). Um estudo realizado em células em

cultura evidenciou que a sinalização desse fator de transcrição no epitélio tubular renal está diminuída na hiperglicemia secundariamente a sua glicosilação pela via da hexosamina. Os autores deste estudo sugerem que a reabsorção de tiamina pelo epitélio tubular poderia estar diminuída nos pacientes diabéticos devido à menor ativação do Sp1 e consequente menor expressão do THTR1 e THTR2, o que explicaria o *clearance* aumentado de tiamina. Thornalley et al. levantaram a hipótese que as alterações observadas no manejo renal da tiamina nos portadores de DM seriam um marcador precoce de disfunção renal associada ao túbulo proximal, onde ocorre a reabsorção de tiamina (39).

O *status* tiamínico e o risco de declínio precoce da função renal foram avaliados em 1.602 pacientes com DM1 seguidos por 15 anos no *Joslin Center*. Durante o seguimento, 109 pacientes desenvolveram microalbuminúria. Entre esses pacientes, foram identificados aqueles com declínio lento e aqueles com declínio rápido da TFG e as concentrações plasmáticas e urinárias de tiamina foram determinadas. As concentrações plasmáticas de tiamina estavam significativamente diminuídas (em 86% em relação aos controles). A excreção urinária de tiamina estava significativamente mais alta (1) nos pacientes com microalbuminúria em relação àqueles com normoalbuminúria e (2) nos pacientes com declínio precoce da função renal em relação aos pacientes com função renal estável. Um modelo de regressão logística identificou três fatores independentemente associados ao declínio precoce da função renal: HbA1c, taxa do logaritmo da concentração urinária de tiamina pela concentração

urinária de creatinina e o logaritmo da taxa de albumina urinária. Esses resultados sugerem que a excreção urinária aumentada de tiamina pode ser um risco preditivo de declínio precoce da função renal em pacientes diabéticos (47).

1.6 A beta 2 microglobulina e a nefropatia diabética

A proteína sérica β 2-microglobulina é codificada pelo gene *B2M*. Esta proteína encontra-se associada com a cadeia β das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e tem sua expressão aumentada em células inflamatórias e tumorais (48). A B2M é bem conhecida em nefrologia pelo aumento de suas concentrações séricas em paralelo com a queda da TFG e por sua participação na amiloidose associada à hemodiálise (49).

Como uma proteína de baixo peso molecular, a B2M é filtrada pelos glomérulos e quase totalmente reabsorvida no túbulo proximal. Embora o aumento da excreção urinária de B2M secundariamente a uma reabsorção prejudicada tenha sido proposto como um marcador de dano celular tubular proximal (50), isto é verdade apenas quando a produção de B2M e a TFG são normais e a proteinúria é mínima (48). Assim, na ND albuminúrica a significância de B2M urinária é provavelmente incerta. Por outro lado, a infiltração local de células inflamatórias é uma característica da tubulopatia diabética e esta é acompanhada por alterações importantes no fenótipo das

células tubulares (19), as quais podem incluir aumento da expressão do gene codificante da *B2M*.

Concentrações elevadas de B2M já foram associadas com aumento da mortalidade em pacientes com DRC (51), DM (52), e até na população geral (53), o que tem sido atribuído a sua capacidade de provocar inflamação (54). Apesar do conhecimento relacionado à B2M sistêmica, pouco é sabido sobre a sua expressão renal.

O estudo da ativação ou inativação intrarrenal de vias potencialmente associadas à progressão da ND é dificultada pela necessidade de biópsia renal. Atualmente, os marcadores da evolução da ND na prática clínica são a TFG estimada (TFGe) e a proteinúria. Ambos podem refletir mudanças funcionais e alterações estruturais já instaladas no rim (55). Há, portanto uma escassez de biomarcadores sensíveis e específicos para a detecção precoce de pacientes em risco para o desenvolvimento da doença renal, bem como uma lacuna no entendimento da etiopatogenia dessa complicação.

2. OBJETIVOS

Avaliar a participação dos genes *TXNIP*, *TXN*, *SLC19A2*, *SLC19A3* e *B2M* como potenciais marcadores do comprometimento renal em portadores de DM1, por meio do estudo da expressão de seus RNA mensageiros (mRNA):

- a. No sedimento urinário de: (1) portadores de DM1 com diferentes graus de comprometimento renal, avaliado tanto pela EUA quanto pela TFGe; (2) portadores de Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF) como modelo de nefropatia não diabética e (3) em indivíduos controles não DM1 e não GESF;
- b. Nas células linfomononucleares periféricas: (1) de portadores de DM1 com diferentes graus de comprometimento renal avaliado tanto pela EUA quanto pela TFGe e (2) de indivíduos controles não DM1;
- c. Em culturas de células renais HEK-293 mantidas em condições que mimetizam o ambiente diabético.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Protocolo *in vivo*

Foram selecionados portadores de DM1 acompanhados no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O DM1 foi definido como deficiência absoluta de secreção de insulina devido à destruição auto-imune das células β pancreáticas e presença de auto-anticorpos, tais como anticorpo anti-insulina, anti-descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD₆₅), e anti-tirosinas fosfatases IA-2 e IA-2 β (56). Foram excluídos pacientes que haviam realizado transplante renal e aqueles que apresentavam TFG_e <60 mL/min/1,73 m² sem a presença de retinopatia diabética, para diminuir as chances de incluir pacientes com doença renal de outras etiologias que não o DM.

Os seguintes dados clínicos foram coletados: idade atual, idade ao diagnóstico, etnia auto-referida, tempo de diagnóstico, controle glicêmico atual e pregresso, outras comorbidades, como hipertensão arterial sistêmica (HAS) - pressão arterial maior que 140 x 90 mmHg em, pelo menos, três medidas em posição sentada, ou uso de medicação antihipertensiva -, tabagismo e uso de hipolipemiante.

Também foi registrada a utilização de inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA), de inibidores do receptor da angiotensina II (BRA) e de drogas hipolipemiantes (estatinas e fibratos). Os dados do exame físico registrados foram: peso, estatura e pressão arterial.

Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), os seguintes dados bioquímicos foram avaliados: HbA1c, colesterol total e frações, triglicérides (TG), creatinina sérica e dosagem da EUA (pelo menos duas medidas em um período de seis meses).

A HbA1c foi medida pelo método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). As dosagens do colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) e TG foram realizadas pelos respectivos métodos enzimáticos (colorimétrico automatizado). As concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram calculadas pelo uso da fórmula de Friedewald ou medidas diretamente (método cinético automatizado) na vigência de hipertrigliceridemia. As concentrações de creatinina sérica foram medidas pela reação de Jaffé. A EUA foi mensurada em amostras de urina de 24 horas pelo método de cloreto de benzetônio ou em amostra de urina isolada por nefelometria.

3.1 Extração do RNA do sedimento urinário

As amostras de urina foram colhidas em recipientes plásticos de 200 mL, estéreis, livres de RNases (Nunc Thermo Fisher). Uma alíquota de cada amostra foi submetida a um exame de Urina tipo 1 para detectar a presença de leucocitúria (>10.000 células/mm³ de urina). As amostras que apresentaram tal característica foram descartadas. Os pacientes excluídos foram eventualmente incluídos em outras oportunidades de coleta, após a normalização da leucocitúria.

As amostras de urina foram centrifugadas a 3.000g por 30 min a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi lisado com 1 mL de Trizol (Life Technologies, EUA) + 0,1% de 2-betamercaptoetanol (Sigma Aldrich). As amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 5 min e a seguir foram armazenadas em *freezer* - 80° C por até um mês. As amostras foram descongeladas em gelo, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e centrifugou-se a 12.000g, por 5 min a 4° C. A fase do sobrenadante contendo o RNA foi submetida a extração com uso do estojo comercial *RNeasy mini kits* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

A etapa contendo trizol+clorofórmio possibilitou a extração do RNA de forma mais limpa e com menor contaminação por DNA genômico (gDNA), uma vez que na separação de fases com clorofórmio, apenas a fase contendo RNA foi transferida para o estojo comercial de extração.

A integridade e a quantidade do RNA total foram analisadas em BioAnalyzer Agilent 2100 com os estojo comercial Agilent RNA 6000 Nano Chips (Waldbronn, Alemanha).

3.2 Extração do RNA das células linfomononucleares

Após a obtenção do TCLE, o sangue periférico dos pacientes DM1 foi colhido em tubos BD Vacutainer CPT (BD, Becton Dickinson, USA), específico para separação de células linfomononucleares, que se baseia na extração pelo método do Ficoll, descrito por Boyum (1968) (57).

Logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas em temperatura ambiente a 1.700g por 30 min. A fase que contém os linfócitos e monócitos foi separada em tubo à parte e as células foram lavadas quatro vezes com tampão fosfato-salino (PBS) com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), pH 7,4, seguido por centrifugação. O RNA total das células linfomononucleares foi extraído de acordo com o protocolo descrito no item 3.1 e sua quantificação foi feita em aparelho NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer). A avaliação de integridade foi feita após eletroforese em gel de agarose a 1% corado com *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia).

3.3 Expressão do mRNA dos genes *TXNIP*, *TXN*, *SLC19A2*, *SLC19A3*, *B2M*, *SLC5A2* e *NPHS2* no sedimento urinário por qPCR

Além dos genes-alvo que são objeto do presente estudo, os genes *SLC5A2* e *NPHS2* foram avaliados com o objetivo de caracterizar os tipos celulares presentes no sedimento urinário, uma vez que o *SLC5A2* codifica o transportador de glicose acoplado a sódio SGLT2, expresso nas células do segmento S1 do túbulo contornado proximal e o *NPHS2* codifica a podocina, expressa nos podócitos.

Para a realização dos experimentos de expressão dos genes *TXNIP*, *TXN*, *SLC19A2*, *SLC19A3*, *B2M*, *SLC5A2* e *NPHS2* no sedimento urinário

realizou-se primeiramente a pesquisa dos genes endógenos mais adequados.

Essa padronização foi necessária, pois os resultados encontrados no estudo piloto de expressão gênica com a utilização dos genes endógenos *GAPDH* e *18S*, não foram satisfatórios. Observamos que estes genes, ainda que utilizados na literatura para estudo do sedimento urinário (58-60), tiveram grande variabilidade nas amostras testadas, sendo inadequados para uso como controle interno em nossos experimentos. Sendo assim, optamos pela procura de genes endógenos mais adequados com uso das placas *TaqMan® Array Human Endogenous Controls* (Life Technologies), que consiste em uma placa pré-configurada contendo sondas para 32 genes endógenos comumente utilizados para expressão gênica, em triplicata (Figura 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB
B	ACTB	B2M	HMBS	IPC8	ACTB	B2M	HMBS	IPC8	ACTB	B2M	HMBS	IPC8
C	PGK1	RPLP0	TBP	TFRC	PGK1	RPLP0	TBP	TFRC	PGK1	RPLP0	TBP	TFRC
D	UBC	YWHAZ	PPIA	POLR2A	UBC	YWHAZ	PPIA	POLR2A	UBC	YWHAZ	PPIA	POLR2A
E	CASC3	CDKN1A	CDKN1B	GADO45A	CASC3	CDKN1A	CDKN1B	GADO45A	CASC3	CDKN1A	CDKN1B	GADO45A
F	PUM1	PSMC4	EIF2B1	PES1	PUM1	PSMC4	EIF2B1	PES1	PUM1	PSMC4	EIF2B1	PES1
G	ABL1	ELF1	MT-ATP6	MRPL19	ABL1	ELF1	MT-ATP6	MRPL19	ABL1	ELF1	MT-ATP6	MRPL19
H	PCP4	RPL37A	RPL30	RPS17	PCP4	RPL37A	RPL30	RPS17	PCP4	RPL37A	RPL30	RPS17

Figura 3 – Representação esquemática da placa *TaqMan® Array Human Endogenous Controls* contendo 32 genes endógenos em triplicata.

Foram realizados ensaios separados para cada grupo de estudo (DM1, GESF e controles não diabéticos). Para cada grupo de estudo foi preparado um *pool* de RNAs composto por 10 amostras para a placa de

DM1, 10 amostras para a placa de controles não diabéticos e 4 amostras para a placa de GESF. Todos os *pools* continham 100 ng de RNA total/reação, que foi convertido em DNA complementar (cDNA) por reação de RT-PCR.

O cDNA foi aplicado nas placas pré-configuradas numa concentração final de 5 ng/10 µL de reação. As reações de qPCR foram realizadas em triplicata no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Life Technologies).

Os resultados foram analisados no programa *Data Assist* (Life Technologies) e na página <http://www.leonxie.com/referencegene>, que compila diversos programas de análises para genes endógenos como *Genorm*, *Normfinder* e *BestKeeper* e Delta Ct.

Os ensaios de expressão foram feitos a partir de 100 ng de RNA total, convertidos para cDNA por reação de RT-PCR com uso do estojo comercial *High Capacity RNA-to-cDNA* (Life Technologies). As reações de qPCR foram realizadas em duplicata no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Life Technologies) com 10 ng de cDNA por reação.

Os resultados foram analisados pelo método de quantificação relativa (Ct, *cycle threshold*) com normalização por um gene endógeno de referência (61), utilizando-se a fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene-alvo} - Ct \text{ controle endógeno}$$

Onde o Ct do gene-alvo e o Ct do gene controle endógeno correspondem à média dos valores de Ct das duplicatas.

Antes de realizar as análises estatísticas, os valores de expressão gênica relativa e de EUA foram transformados em $\log_{10}$. As análises foram realizadas no *software* JMP (SAS Institute). Foi utilizado o teste não-paramétrico de Wilcoxon, seguido do pós teste de Tukey para as análises compostas de três grupos ou mais. Nas análises de correlação entre a expressão do mRNA do sedimento urinário e a EUA, somente foram considerados os pacientes com valores de EUA em amostras isoladas de urina de até 500 mg/g de creatinina (62). Para as análises de correlação foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Um $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.4 Expressão do mRNA dos genes *TXNIP*, *TXN*, *SCL19A2* e *B2M* nas células linfomononucleares por qPCR

Para realização dos experimentos de expressão dos genes *TXNIP*, *TXN*, *SLC19A2* e *B2M* nas células linfomononucleares de portadores de DM1, realizou-se primeiramente a pesquisa dos genes controle endógenos mais adequados. Esta padronização já havia sido realizada em projeto de outra aluna do nosso grupo, no qual foram selecionados os genes da hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (*HPTR1*), da β -actina (*ACTB*) e da β 2-microglobulina (*B2M*). Para realizar a seleção do gene mais adequado foram realizados experimentos de qPCR em duplicata com seis amostras de pacientes DM1 e três amostras de indivíduos controles não diabéticos.

Os resultados foram analisados no programa *Genorm*, que mostrou que os genes *B2M* e *ACTB* eram os mais estáveis em células linfomononucleares. Sendo assim, optamos por utilizar o *ACTB* como controle endógeno nos experimentos de expressão gênica, uma vez que o *B2M* poderia ser modulado pelo *status* da doença renal, conforme se discutirá posteriormente.

Os ensaios de expressão gênica nas células linfomononucleares foram feitos a partir de 500 ng de RNA total convertidos para cDNA por reação de RT-PCR com uso do estojo comercial *High Capacity RNA-to-cDNA* (Life Technologies). As reações de qPCR foram realizadas em duplicata no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Life Technologies) com 10 ng de cDNA por reação.

Os resultados foram analisados pelo método de quantificação relativa (Ct) com normalização a um gene endógeno de referência (61), conforme descrito para a análise do mRNA do sedimento urinário.

Antes de realizar as análises estatísticas, os valores de expressão gênica relativa foram transformados em $\log_{10}$. As análises foram realizadas no *software* JMP (SAS Institute). Foi utilizado o teste não-paramétrico de Wilcoxon, seguido do pós teste de Tukey para as análises compostas de três grupos ou mais. Para as análises de correlação foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Um $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.5 Avaliação da concentração de tiamina plasmática em sangue total

As concentrações de tiamina plasmática dos portadores de DM1 com diferentes graus de ND foram avaliadas pelo método HPLC em laboratório externo (Laboratório Fleury).

De maneira resumida, foram colhidos em tubos BD Vacutainer contendo EDTA potássico 3 mL de sangue periférico de 32 pacientes DM1 e de 20 controles não diabéticos, em jejum de 12 horas.

As amostras foram mantidas protegidas da luz e congeladas por um período de, no máximo, 30 dias, antes de serem encaminhadas para o laboratório de análises clínicas. Os valores são considerados normais quando estão no intervalo entre 74 a 222 mmol/L (25 a 85 ng/mL).

Protocolo *in vitro*

3.6 Cultura de linhagem de células epiteliais renais humanas

A linhagem HEK293 é originária de células de rim embrionário humano e tem sido usada em alguns protocolos de estudo da nefropatia e da ação dos AGEs (63, 64).

As células HEK293 foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,2% de solução contendo 10.000 unidades/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina (Life

Technologies). O meio de cultura foi trocado a cada dois ou três dias até as células atingirem, no máximo, 80% de confluência e os frascos de cultura foram mantidos em estufa a 37°C a 5% de CO₂.

3.7 Tratamentos das células HEK293 com glicose e albumina glicada

As células em cultura foram expostas às seguintes condições experimentais: (1) meio de cultura com 5,6 mM glicose; (2) meio de cultura com 25 mM de glicose (450 mg/dL), (3) meio de cultura com 25 mM de glicose + 1 mg/mL de albumina controle não glicada (Alb Ctrl); (4) meio de cultura com 25 mM de glicose + 1 mg/mL de albumina glicada (Alb AGE). Os tratamentos foram realizados por 24, 72 e 120 horas.

A concentração de 25 mM é a mesma utilizada em experimentos com altas concentrações de glicose descritos em estudos com células HEK293 (37, 65). Já os tratamentos com albumina controle não glicada e albumina glicada foram realizados para mimetizar o ambiente proteinúrico de nefropatas não diabéticos e diabéticos, respectivamente.

A albumina glicada, preparada conforme protocolo previamente descrito (66) foi cedida pela Dra. Marisa Passarelli, do Laboratório de Lípidos (LIM10) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.8 Extração de RNA das células HEK293

Ao atingirem confluência de, aproximadamente, 80% as células HEK293 tiveram seu RNA total extraído utilizando-se o protocolo descrito no item 3.1. A integridade foi avaliada de acordo com o protocolo descrito no item 3.2.

Os ensaios de expressão foram feitos a partir de 1.000 ng de RNA total, convertidos para cDNA por reação de RT-PCR com uso do estojo comercial *High Capacity RNA-to-cDNA* (Life Technologies). As reações de qPCR foram realizadas em duplicata no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Life Technologies) com 50 ng de cDNA por reação.

O gene endógeno utilizado para esta cultura celular foi o RNA ribossomal 18S, conforme demonstrado por Randall e cols (67), que em nossos experimentos também foi expresso de maneira estável.

Os resultados foram analisados pelo método de quantificação relativa (Ct) com normalização a um gene endógeno de referência (61), conforme descrito anteriormente para as análises do protocolo *in vivo*. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

Antes de realizar as análises estatísticas, os valores de expressão gênica relativa foram transformados em $\log_{10}$. As análises foram realizadas no *software* JMP (SAS Institute). Foi utilizado o teste não-paramétrico de Wilcoxon, seguido do pós teste de Tukey para as análises compostas de três grupos ou mais. Para as análises de correlação foi utilizado o

coeficiente de correlação de Spearman. Um $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Ensaios de expressão do mRNA no sedimento urinário

As análises das placas contendo amostras dos três grupos de estudo na forma de *pool*, para avaliação dos genes endógenos candidatos demonstraram que os genes mais estáveis foram os codificantes da β 2 microglobulina (*B2M*) e o da ciclofilina A (*PPIA*), seguidos dos genes da fosfoglicerato cinase 1 (*PGK1*) e do fator de transcrição relacionado a ETS (*ELF1*) (Figura 4).

Figura 4 - Ranking de estabilidade, conforme avaliado pelo Genorm, para cada um dos genes endógenos testados no sedimento urinário – os menores valores correspondem aos genes mais estáveis nos grupos testados.

Realizamos, então, um experimento com o gene-alvo *TXNIP* e os genes endógenos sugeridos na avaliação por *pool* em oito amostras individuais (DM1= 6 e Controles= 2).

A análise pelo *software Data Assist* mostrou que o gene *ELF1* foi mais estável que o *PGK1* e que o *PPIA*. Assim prosseguimos os experimentos de expressão com uso do gene endógeno *ELF1*.

Para os experimentos de expressão gênica, foram consideradas 55 amostras de portadores de DM1 com diferentes estágios de ND. A distribuição nos grupos de estudo das amostras coletadas que resultaram em RNA de boa qualidade está descrita a seguir:

Portadores de DM1 – pacientes acompanhados no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da FMUSP, classificados e agrupados com base no *status* da EUA:

Grupo Ausência de ND: 22 pacientes com normoalbuminúria (EUA <30 mg/g de creatinina em duas amostras de urina isoladas);

Grupo ND incipiente: 11 pacientes com microalbuminúria (EUA >30 mg/g e <300mg/g de creatinina em duas amostras de urina isoladas);

Grupo ND instalada: 22 pacientes com macroalbuminúria (EUA >300 mg/g de creatinina em duas amostras de urina isoladas);

Os pacientes também foram classificados de acordo com a TFGe, calculada pela fórmula CKD-EPI (68):

Grupo ≥ 60 : 33 pacientes com TFGe ≥ 60 mL/ min/1,73 m²;

Grupo <60: 22 pacientes com TFGe <60 mL/ min/1,73 m².

Portadores de GESF – 13 pacientes acompanhados no Ambulatório de Nefrologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. Esses pacientes apresentam média de TFGe de 52 mL/ min/1,73 m² e média de proteinúria de 24 horas de 2,35 gramas.

Controles não diabéticos, não nefropatas – 11 indivíduos saudáveis não portadores de diabetes ou de doença renal utilizados como controles.

As características clínicas e laboratoriais dos portadores de DM1 incluídos no estudo da expressão do mRNA de sedimento urinário são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características clínicas e laboratoriais dos portadores de DM1 de acordo com os graus de nefropatia diabética (ND) e da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe)

	Nefropatia Diabética			Valor de p	TFGe (mL/min/1,73m ²)		Valor de P
	Ausente (n=22)	Incipiente (n=11)	Instalada (n=22)		≥60 (n=33)	<60 (n=22)	
Sexo (Feminino/Masculino)	13/9	8/3	12/10	n/s	17/16	16/6	n/s
Idade (anos)	33 (27-41)	38 (28-47)	31 (25-40)	n/s	30,5 (25,2-38)	36,5 (28,7-44,7)	n/s
Duração do diabetes (anos)	20 (14-29)	29 (16-33)	17,5 (14-24)	n/s	21 (15-28)	21,5 (14-30)	n/s
Hipertensão Arterial (%)	36	54	68	n/s	36	77	0,0053
Uso de IECA ou BRA (%)	45	90	90	0,001	63	86	n/s
HbA _{1c} (%)	8 (6,8-8,8)	8,6 (7,9-9)	8,2 (7,2-9,1)	n/s	8,3 (7,2-8,9)	8,1 (7,2-9,1)	n/s
Colesterol (mg/dL)	162 (148-191)	179 (150-220)	192,5 (163-222)	n/s	171 (149-201)	189,5 (156-209)	n/s
Triglicérides (mg/dL)	78 (53-88)	80 (63-91)	99,5 (70-145)	0,02	75 (55-88,5)	104 (81-128)	0,0006

Dados expressos em mediana ± intervalo interquartilico. IECA: inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA: bloqueador do receptor de angiotensina

▪ Gene *SLC5A2*

O ensaio de expressão do gene *SLC5A2*, que codifica o SGLT2, mostrou que o sedimento urinário dos três grupos de estudo possui células tubulares proximais. Além disso, a análise estatística demonstrou aumento da expressão deste gene no grupo GESF quando comparado aos grupos controle ($P= 0,0005$) e DM1 ($P= 0,005$) (Figura 5). A análise apenas dos pacientes DM1 classificados de acordo com a presença ou ausência de ND e com a TFGe mostrou aumento da expressão de *SLC5A2* tanto naqueles com ND (incipiente + instalada) em relação aos com ausência de ND ($P= 0,005$) (Figura 6) como naqueles com TFGe <60 em relação aqueles com TFGe ≥ 60 mL/min ($P= 0,044$) (Figura 7).

Figura 5 - Expressão relativa do gene que codifica o SGLT2 (*SLC5A2/ELF1*) em sedimento urinário de indivíduos controles, portadores de diabetes tipo 1 (DM1) e de glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

Figura 6 - Expressão relativa do gene que codifica o SGLT2 (*SLC5A2/ELF1*) em sedimento urinário de portadores de DM1 com ausência e presença de nefropatia diabética. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

Figura 7 - Expressão relativa do gene que codifica o SGLT2 (*SLC5A2/ELF1*) em sedimento urinário de portadores de DM1 de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos

▪ Gene *NPHS2*

O ensaio de expressão do gene que codifica a podocina (*NPHS2*) não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo. No entanto, foi possível demonstrar que o sedimento urinário dos três grupos de paciente possui podócitos (Figura 8). A análise dos pacientes DM1 classificados de acordo com a ND mostrou aumento da expressão de *NPHS2* nos pacientes com ND quando comparada ao grupo sem ND ($P=0,0008$) (Figura 9). A expressão de *NPHS2* também mostrou uma correlação positiva com a EUA ($P=0,0018$, $r=0,62$) (Gráfico 1).

Figura 8 - Expressão relativa do gene que codifica a podocina (*NPHS2/ELF1*) em sedimento urinário de indivíduos controles, de portadores de DM1 e de glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

Figura 9 - Expressão relativa do gene que codifica a podocina (*NPHS2/ELF1*) em sedimento urinário de pacientes DM1 com ausência e presença de nefropatia diabética. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

Gráfico 1 - Correlação entre a expressão do gene que codifica a podocina (*NPHS2/ELF1*) e a excreção urinária de albumina (mg/g) nos pacientes DM1. r = coeficiente de correlação de Spearman.

▪ Gene *TXNIP*

Os ensaios de expressão de *TXNIP* mostraram que entre os três grupos de estudo, houve maior expressão deste gene no sedimento urinário

dos pacientes DM1 ($P= 0,0023$) e dos pacientes GESF ($P= 0,0027$) em relação aos controles (Figura 10).

Considerando apenas os pacientes DM1, a expressão de *TXNIP* foi maior nos pacientes com presença de ND em comparação aos pacientes sem ND ($P= 0,032$) (Figura 11). Da mesma forma, houve aumento da expressão de *TXNIP* nos pacientes DM1 com TFGe $<60\text{mL/min}$ quando comparados aos com TFGe $\geq 60\text{mL/min}$ ($P= 0,046$) (Figura 12).

Figura 10 - Expressão relativa do gene que codifica a TXNIP (*TXNIP/ELF1*) em sedimento urinário de indivíduos controle, de portadores de DM1 e de glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

Figura 11 - Expressão relativa do gene que codifica a TXNIP (*TXNIP/ELF1*) em sedimento urinário de pacientes DM1 com ausência e presença de nefropatia diabética. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

Figura 12 - Expressão relativa do gene que codifica a TXNIP (*TXNIP/ELF1*) em sedimento urinário de portadores de DM1 de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

A expressão de *TXNIP* também mostrou uma correlação negativa com a TFGe nos pacientes DM1 ($P= 0,04$, $r= -0,28$) (Gráfico 2A). Após a estratificação por sexo, observou-se uma correlação significativa apenas nos pacientes do sexo masculino ($P= 0,007$, $r= -0,61$) (Gráfico 2C).

Gráfico 2- Correlação entre a expressão do mRNA de *TXNIP/ELF1* e a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) em (A) pacientes DM1; (B) pacientes DM1 do sexo feminino; e (C) pacientes DM1 do sexo masculino. r = coeficiente de correlação de Spearman.

Quarenta e cinco pacientes DM1 foram seguidos prospectivamente durante uma mediana de tempo de 24 meses. Esses pacientes foram classificados de acordo com a magnitude do declínio da TFGe. Aqueles com perda maior que ≥ 5 mL/min/1,73 m² por ano ($n=16$, considerados como declinantes) apresentaram maior expressão de *TXNIP* que aqueles que perderam <5 mL/min/1,73 m² por ano ($n=29$, considerados como não-declinantes) ($P = 0,0047$) (Figura 13). As razões de probabilidade positivas e negativas de expressão do *TXNIP* para a previsão de declínio da TFG ≥ 5 mL/min/1,73 m² por ano foram 3,88 e 0,57, respectivamente. Essas razões

foram calculadas a partir de um valor obtido na curva ROC (*Receiver Operator Characteristic*).

Figura 13 – Expressão do gene que codifica a TXNIP (*TXNIP/ELF1*) no sedimento urinário de pacientes DM1 classificados de acordo com a perda da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). Não-declinantes e declinantes perderam, respectivamente, <5 e ≥ 5 mL/min/1,73 m². Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

▪ Gene *TXN*

Os ensaios de expressão de *TXN* não mostraram diferença entre os três grupos de estudo (Figura 14). Considerando apenas os pacientes DM1, a expressão de *TXN* foi maior naqueles com TFGe <60 mL/min/1.73m² em relação àqueles com TFGe ≥ 60 mL/min/1.73m² ($P = 0,008$) (Figura 15).

Figura 14 - Expressão relativa do gene que codifica a TXN (*TXN/ELF1*) em sedimento urinário de indivíduos controle e de portadores de DM1 e de glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

Figura 15 - Expressão relativa do gene que codifica a TXN (*TXN/ELF1*) em sedimento urinário de pacientes DM1 de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

No estudo prospectivo, não foi encontrada associação entre a expressão de *TXN* e a magnitude do declínio da TFGe no sedimento urinário dos pacientes DM1.

▪ Gene *SLC19A2*

Os ensaios de expressão do gene que codifica o transportador de tiamina tipo 1 (*SLC19A2*) mostraram que, entre os três grupos de estudo, houve maior expressão deste gene no sedimento urinário dos pacientes GESF ($P= 0,036$) e dos pacientes DM1 ($P= 0,018$) em relação aos controles (Figura 16).

Já na análise com os pacientes DM1 classificados de acordo com a presença ou ausência de ND, a expressão do gene *SLC19A2* foi maior nos pacientes DM1 com ND em comparação aos pacientes sem ND ($P= 0,006$) (Figura 17). Também observou-se aumento da expressão de *SLC19A2* nos portadores de DM1 com $\text{TFGe} < 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$, quando comparados ao grupo com $\text{TFGe} \geq 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ ($P= 0,008$) (Figura 18).

Figura 16 - Expressão relativa do gene que codifica o transportador de tiamina tipo 1 (*SLC19A2/ELF1*) no sedimento urinário de indivíduos controle e de portadores de DM1 e de glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

Figura 17 - Expressão relativa do gene que codifica o transportador de tiamina tipo 1 (*SLC19A2/ELF1*) no sedimento urinário de pacientes DM1 com presença e ausência de nefropatia diabética. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

Figura 18 - Expressão relativa do gene que codifica o transportador de tiamina tipo 1 (*SLC19A2/ELF1*) em sedimento urinário de pacientes DM1 de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

A expressão de *SLC19A2* mostrou uma correlação negativa com a TFGe nos pacientes DM1 ($P= 0,01$, $r= -0,37$), que foi mais forte no sexo masculino ($P= 0,02$, $r= -0,52$) que no sexo feminino ($P= 0,03$, $r= -0,39$)

(Gráfico 3). De maneira inversa a expressão de *SLC19A2* mostrou uma correlação positiva com creatinina plasmática nestes pacientes ($P= 0,002$, $r= 0,43$) (Gráfico 4).

Gráfico 3 - Correlação entre a expressão do gene que codifica o transportador de tiamina tipo 1 (*SLC19A2/ELF1*) e a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) nos pacientes DM1. r = coeficiente de correlação de Spearman.

Gráfico 4 - Correlação entre a expressão do gene que codifica o transportador de tiamina tipo 1 (*SLC19A2/ELF1*) e a creatinina plasmática nos pacientes DM1. $r =$ coeficiente de correlação de Spearman.

No estudo prospectivo, não foi encontrada associação entre a expressão do gene *SLC19A2* e a magnitude do declínio da TFGe no sedimento urinário dos pacientes DM1.

▪ Gene *SLC19A3*

Não observamos a expressão do gene *SLC19A3* no mRNA de sedimento urinário obtido de nenhum dos grupos estudados (controles, pacientes DM1 e pacientes GESF).

▪ Gene *B2M*

A expressão de *B2M* não diferiu significativamente entre os grupos controle, DM1 e GESF (Figura 19). Na análise apenas dos pacientes DM1, observou-se aumento da expressão relativa deste gene no grupo com ausência de ND em comparação ao grupo com presença de ND ($P = 0,005$).

e no grupo com $\text{TFGe} < 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$, quando comparado ao grupo com $\text{TFGe} \geq 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ ($P= 0,008$) (Figuras 20 e 21, respectivamente).

Figura 19 - Expressão relativa do gene que codifica a beta 2 microglobulina (*B2M/ELF1*) em sedimento urinário de indivíduos controles e de portadores de DM1 e de glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

Figura 20 - Expressão relativa do gene que codifica a beta 2 microglobulina (*B2M/ELF1*) em sedimento urinário de pacientes DM1 com presença e ausência de nefropatia diabética. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

Figura 21 - Expressão relativa do gene que codifica a beta 2 microglobulina (*B2M/ELF1*) em sedimento urinário de pacientes DM1 de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

A expressão de *B2M* mostrou uma correlação negativa com a TFGe nos pacientes DM1 ($P= 0,01$, $r= -0,33$) (Gráfico 5A). Após a estratificação por sexo, a correlação manteve-se significativa apenas nos pacientes do sexo masculino ($P= 0,01$, $r= -0,57$) (Gráfico 5C).

Gráfico 5 – Correlação entre a expressão do gene que codifica a beta 2 microglobulina (*B2M/ELF1*) no sedimento urinário e a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) em (A) pacientes DM1; (B) pacientes DM1 do sexo feminino; e (C) pacientes DM1 do sexo masculino. r = coeficiente de correlação de Spearman.

De maneira inversa, a expressão de *B2M* mostrou uma correlação positiva com a creatinina plasmática dos pacientes DM1 ($P=0,01$, $r=0,34$) (Gráfico 6A). Após a estratificação por sexo, a correlação manteve-se significativa apenas nos pacientes do sexo masculino ($P=0,03$, $r=0,47$) (Gráfico 6C).

Gráfico 6 - Correlação entre a expressão do gene que codifica a $\beta 2$ -microglobulina (*B2M/ELF1*) no sedimento urinário de portadores de DM1 e a creatinina plasmática. r = coeficiente de correlação de Spearman.

Considerando-se apenas os participantes com TFGe ≥ 60 mL/min/1,73m², os níveis de expressão de *B2M* foram maiores nos pacientes com ND instalada, em relação aos pacientes sem ND (Figura 22). Ao contrário, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão *B2M* quando os participantes com presença de ND foram estratificados pela TFGe $<$ ou ≥ 60 mL/min/1,73 m².

Figura 22 - Expressão relativa do gene que codifica a beta 2 microglobulina (*B2M/ELF1*) em sedimento urinário de pacientes DM1 de acordo com a presença e ausência de nefropatia diabética (ND) nos participantes com taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) ≥ 60 mL/min/1,73 m². Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

A análise dos participantes com TFGe < 60 mL/min/1,73 m² estratificados pela presença ou ausência de ND, bem como a análise dos pacientes com ausência de ND estratificados pela TFGe não foram realizadas porque havia apenas um participante com TFGe < 60 mL/min/1,73 m² e com ausência de ND.

4.2 Ensaios de expressão do mRNA em células linfomononucleares

A análise dos experimentos para definição do gene controle endógeno mostrou que os genes *B2M* e o *ACTB* foram os mais estáveis em células linfomononucleares (Figura 23); optamos por utilizar o *ACTB*.

Figura 23 - Estabilidade dos genes *B2M*, *ACTB* e *HPTR1* obtida pelo programa *Genorm* a partir dos resultados de expressão gênica de um experimento piloto em seis pacientes DM1 e em três indivíduos controles.

Para os experimentos de expressão gênica, foram coletadas 162 amostras de portadores de DM1 com diferentes estágios de doença renal. A distribuição nos grupos de estudo das amostras é descrita a seguir:

Portadores de DM1 – pacientes acompanhados no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da FMUSP, classificados com base no *status* da EUA:

Grupo Ausência de ND: 117 pacientes com normoalbuminúria;

Grupo ND incipiente: 21 pacientes com microalbuminúria;

Grupo ND instalada: 24 pacientes com macroalbuminúria.

Os pacientes também foram classificados de acordo com a TFGe pela fórmula CKD-EPI (68):

Grupo ≥ 60 : 129 pacientes com TFGe ≥ 60 mL/ min/1,73 m²;

Grupo <60: 33 pacientes com macroalbuminúria e TFGe <60 mL/min/1,73 m².

Controles não diabéticos, não nefropatas – 26 indivíduos saudáveis não portadores de diabetes ou de doença renal utilizados como controles.

- **Gene *TXNIP***

A análise da expressão de *TXNIP* nas células linfomononucleares mostrou aumento da expressão deste gene nos pacientes DM1 em relação aos indivíduos controles ($P < 0,0001$) (Figura 24).

Considerando apenas o grupo DM1, a expressão de *TXNIP* não diferiu quando os pacientes foram classificados quanto a presença ou ausência de ND ou quanto a TFGe < ou ≥ 60 mL/min/1,73 m².

Figura 24 - Expressão relativa do gene que codifica a TXNIP (*TXNIP/ACTB*) em células linfomononucleares de indivíduos controle e de portadores de DM1. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

- **Gene *TXN***

A expressão do mRNA de *TXN* em células linfomononucleares foi significativamente maior nos pacientes DM1 que nos indivíduos controles. ($P= 0,002$) (Figura 25). Entretanto, não houve diferença na expressão deste gene entre os pacientes DM1 com e sem ND e entre aqueles com TFG $< 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$ ou $\geq 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$.

Figura 25 - Expressão relativa do gene que codifica a TXN (*TXN/ACTB*) em células linfomononucleares de indivíduos controle e de portadores de DM1. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

Foi observada uma correlação positiva entre as expressões de *TXN* e *TXNIP* nas células linfomononucleares dos pacientes DM1 ($P < 0,0001$, $r = 0,40$) (Figura 26).

Figura 26 - Correlação positiva entre expressões de *TXNIP* e *TXN* em células linfomononucleares de pacientes DM1. r = coeficiente de correlação de Spearman.

- **Gene *SLC19A2***

A expressão do gene *SLC19A2* nas células linfomononucleares não apresentou diferença entre os grupos de pacientes avaliados (Figura 27).

Figura 27 - Expressão relativa do gene que codifica o transportador de tiamina 1 (*SLC19A2/ACTB*) em células linfomononucleares de indivíduos controle e de portadores de DM1. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

- **Gene *SLC19A3***

Não observamos a expressão do gene *SLC19A3* nas células linfomononucleares obtidas de indivíduos controles e de pacientes com DM1.

- **Gene *B2M***

A expressão de *B2M* nas células linfomononucleares não apresentou diferenças entre os grupos de pacientes avaliados (Figura 28).

Figura 28 - Expressão relativa do gene que codifica a beta 2 microglobulina (*B2M/ACTB*) em células linfomononucleares de indivíduos controle e de portadores de DM1. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

4.3 Concentração plasmática de tiamina em pacientes com DM1

Foram coletadas amostras de sangue de 32 DM1 e 20 controles para avaliação da concentração plasmática de tiamina. Na Tabela 2 são apresentados os valores médios das concentrações, de acordo com a classificação da ND. Segundo o Laboratório Fleury, que realizou as

análises, os valores de referência para as concentrações de tiamina são de 28 a 85 ng/mL.

Tabela 2 - Concentrações de tiamina plasmática em pacientes com diferentes graus de nefropatia diabética.

Grupo	N	Concentração (ng/mL)
Ausência de nefropatia diabética	13	44 (37-51)
Nefropatia diabética incipiente	7	44 (33-51)
Nefropatia diabética instalada	12	49 (38-54)
Controles não diabéticos	20	56 (49-61)

Dados expressos em mediana ± intervalo interquartilico

As análises estatísticas mostraram que as concentrações plasmáticas de tiamina dos indivíduos controle foram significativamente maiores quando comparadas às concentrações dos pacientes DM1 ($P < 0,0001$) (Figura 29). A análise com os pacientes DM1 estratificados pelo *status* de ND mostrou diferença significativa entre o grupo controle e todos os grupos DM1 (Figura 30). No entanto, quando comparou-se apenas os DM1, estratificados tanto pela EUA como pela TFG_e, não houve diferença significativa entre os grupos. Também não houve correlação entre as concentrações plasmáticas de tiamina e a TFG_e ou a EUA.

Figura 29 - Concentrações plasmáticas de tiamina de indivíduos controle e de portadores de DM1. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

Figura 30 - Concentrações plasmáticas de tiamina de indivíduos controle e de portadores de DM1 classificados em nefropatia diabética (ND) ausente, incipiente e instalada. Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

4.4 Ensaios de expressão do mRNA em células embrionárias renais humanas tratadas com glicose e albumina glicada

- **Gene *TXNIP***

Não houve modulação da expressão de *TXNIP* nas células tratadas por 24 horas. Já com 72 horas de tratamento, sua expressão mostrou-se aumentada nas células tratadas com 25 mM de glicose + 1mg/mL de Alb AGE quando comparada às células na condição controle ($P= 0,003$) (Figura 31). Após 120 horas de tratamento, não se observou diferença significativa entre os grupos.

Figura 31 - Expressão relativa do gene que codifica a TXNIP (*TXNIP/18S*) em células HEK293 tratadas por 72 horas com: 5,6 mM glicose (C); 25 mM de glicose (25mM Gli), 25 mM de glicose + 1 mg/mL albumina controle (25mM Gli + Alb Ctrl) e 25 mM de glicose + 1 mg/mL de albumina AGE (25mM Gli + Alb AGE). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

- **Gene *SLC19A2***

Não houve modulação da expressão de *SLC19A2* nas células tratadas por 24 horas. No tratamento de 72 horas, observamos uma diferença significativa após o teste não paramétrico, porém a significância foi perdida no pós-teste (Figura 32). Após 120 horas de tratamento também não se observou diferença significativa entre os grupos.

Figura 32- Expressão relativa do gene que codifica o transportador de tiamina 1 (*SLC19A2/18S*) em células HEK293 tratadas por 72 horas com: 5,6 mM glicose (C); 25 mM de glicose (25mM Gli), 25 mM de glicose + 1 mg/mL albumina controle (25mM Gli + Alb Ctrl) e 25 mM de glicose + 1 mg/mL de albumina AGE (25mM Gli + Alb AGE). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

- **Gene *B2M***

As células tratadas por 24 horas não mostraram diferença significativa entre os grupos em relação a expressão de *B2M*. Já com 72 horas de tratamento, sua expressão mostrou-se aumentada nas células tratadas com 25 mM de glicose + 1 mg/mL de Alb AGE ($P= 0,03$) e nas células tratadas com 25 mM de glicose + 1 mg/mL de Alb Ctrl quando comparadas às células expostas à condição controle ($P= 0,007$) (Figura 33).

Figura 33 - Expressão relativa do gene que codifica a B2M (*B2M/18S*) em células HEK293 tratadas por 72 horas com: 5,6 mM glicose (C); 25 mM de glicose (25mM Gli), 25 mM de glicose + 1 mg/mL de albumina controle (25mM Gli + Alb Ctrl) e 25 mM de glicose + 1 mg/mL de albumina AGE (25mM Gli + Alb AGE). Barras representando a mediana e os intervalos interquartílicos.

A Tabela 3 apresenta resumidamente os resultados encontrados no presente estudo.

Tabela 3 – Resumo dos resultados encontrados nos experimentos de avaliação da expressão dos genes-alvo tanto nos portadores de DM1 quanto nas células HEK 293.

Gene-alvo	Sedimento urinário	Células Linfomononucleares	Células HEK293 – 72h
<i>SLC5A2</i> (codifica o SGLT-2, marcador de célula tubular proximal)	↑ GESF ↑ Presença ND ↑ TFGes <60 mL/min	NA	NA
<i>NPHS2</i> (codifica a podocina)	↑ Presença ND	NA	NA
<i>TXNIP</i>	↑ GESF e DM1 ↑ Presença ND ↑ TFGes <60 mL/min ↑ Declinantes	↑ DM1	↑ 25 mM glicose +Albumina AGE
<i>TXN</i>	↑ TFGes <60 mL/min	↑ DM1	NA
<i>SLC19A2</i> (codifica o THTR1)	↑ GESF e DM1 ↑ Presença ND ↑ TFGes <60 mL/min	Sem diferenças significantes entre DM1 e controles e nos DM1 estratificados pela ND	Sem diferenças significantes entre os grupos
<i>SLC19A3</i> (codifica o THTR2)	Expressão muito baixa	NA	Expressão muito baixa
<i>B2M</i>	↑ Presença ND ↑ TFGes <60 mL/min	Sem diferenças significantes entre DM1 e controles e nos DM1 estratificados pela ND	Sem diferenças significantes entre os grupos

GESF: glomeruloesclerose segmentar e focal, DM1: diabetes mellitus tipo 1; TFGes: taxa de filtração glomerular estimada; NA: não avaliado; ND: nefropatia diabética;

5. DISCUSSÃO

O DM1 figura entre as principais causas da doença renal terminal (69). A glomerulopatia diabética típica está presente em apenas um terço dos portadores de DM2 com microalbuminúria e um terço dos pacientes apresenta ausência de alterações glomerulares, mas expressivo comprometimento túbulo-intersticial (16).

No DM, acredita-se que as células tubulares não sejam afetadas apenas pela proteinúria secundária à lesão glomerular, mas que também sejam primariamente afetadas, uma vez que a própria hiperglicemia e os AGEs exercem efeitos pró-inflamatórios, profibróticos e angiogênicos sobre as células tubulares proximais, estimulando a produção de citocinas, TGF- β e VEGF, respectivamente (70).

Em nosso estudo foram avaliadas as participações da proteína de interação com a tiorredoxina (TXNIP), da tiorredoxina (TXN), do transportador de tiamina tipo 1 (THTR1, codificado pelo gene *SLC19A2*), transportador de tiamina tipo 2 (THTR2, codificado pelo gene *SLC19A3*) e da beta 2 microglobulina (B2M) no comprometimento renal de portadores de DM1.

Inicialmente, caracterizamos o sedimento urinário quanto a presença de células tubulares proximais e de podócitos, evidenciando a expressão, respectivamente, de SGLT2 e de podocina. A maior expressão do gene que codifica o SGLT2 no grupo de pacientes com DM1 em relação ao grupo de controles saudáveis está de acordo com o estudo de Rahmoune et al. (71), que demonstrou o aumento da expressão deste transportador em células tubulares renais isoladas de portadores de DM tipo 2 hiperglicêmicos,

achado esse que explica porque pacientes diabéticos apresentam glicosúria em glicemias bem acima da glicemia na qual o limiar renal de glicose é alcançado em condições fisiológicas (aproximadamente 180 mg/dL).

O achado da maior expressão de *SLC5A2* no grupo de pacientes com GESF em relação ao grupo controle foi inesperado e não encontramos trabalhos publicados na literatura que corroborem esse achado. Encontramos, no entanto, um registro de patente que propõe a avaliação de SGLT2 na urina como marcador diagnóstico de DRC, após a observação de que animais portadores de DRC, especialmente GESF e nefropatia por IGA, apresentam aumento das concentrações urinárias de SGLT2 (72).

Os resultados das análises da expressão no sedimento urinário mostraram alteração na expressão do gene *TXNIP* nos pacientes portadores de ND. A modulação da expressão de *TXNIP* parece ser proporcional ao avanço da ND, conforme mostrado pelas análises dos pacientes estratificados de acordo com a EUA e pela correlação negativa com a TFG_e. Também demonstramos na avaliação prospectiva que houve uma associação entre a maior expressão de *TXNIP* e uma piora da TFG_e, o que sugere que essa proteína participe da deterioração da função renal.

A análise conjunta dos grupos mostrou aumento da expressão de *TXNIP* tanto no grupo DM1 como no grupo GESF em comparação aos controles saudáveis. Esse resultado indica que a expressão de *TXNIP* não é modulada apenas pela hiperglicemia, conforme já descrito na literatura (33, 34, 37, 73-75), mas também por outros fatores que podem causar injúria renal, o que também já foi mostrado em outros modelos de doença renal,

mas não em GESF: um estudo mostrou que a inibição de TXNIP foi protetora na doença renal induzida pela hiperhomocisteinemia, via inibição da ativação do inflamassomo NLRP3 (76). Também foi demonstrado que na injúria renal induzida por adriamicina, uma droga anti-tumorigênica, a diminuição da expressão de TXNIP diminuiu o dano em células tubulares renais e que este mecanismo parece ser mediado pela proteína cinase ativada por AMP (AMPK) (77).

O aumento da expressão de *TXNIP* também já foi descrito em modelos animais de hiperoxalúria (78) e de lesão de podócitos induzida por dieta rica em frutose (79) que, da mesma forma que a hiperhomocisteinemia e a hiperglicemia, aumentam a geração de EROs e a ativação do inflamassomo NLRP3. Considerando que o estresse oxidativo é reconhecido na patogênese da GESF (80), é plausível considerar a participação da TXNIP nesta doença renal.

As análises da expressão de *TXNIP in vitro* em diferentes tempos de tratamento mostraram modulação desse gene apenas em 72 horas. Ainda que já tenha sido demonstrado que altas concentrações de glicose são responsáveis pelo aumento da expressão de *TXNIP* em células tubulares renais (75, 81) nós investigamos os efeitos da albumina AGE nesta modulação. No presente estudo, apenas as células tratadas concomitantemente com altas concentrações de glicose e albumina AGE mostraram aumento significativo na expressão de *TXNIP*. Isto deve-se, provavelmente, ao grande número de grupos experimentais, pois quando fazemos a comparação entre os grupos tratados com 25mM de glicose e o

grupo controle nós encontramos um aumento significativo da expressão de *TXNIP* nas células expostas a altas concentrações de glicose ($P = 0,01$, dados não mostrados). É possível que no DM, assim como observado em nossas condições experimentais, a expressão renal de *TXNIP* induzida por alta glicose seja exacerbada pelos AGEs. Esses compostos também provocam estresse oxidativo (82) e a ativação de RAGE já foi demonstrada na indução de expressão de *TXNIP* em dois tipos celulares envolvidos nas complicações do DM: nas células endoteliais renais (83) e nas células de Schwann (84).

Um achado interessante foi a maior expressão de *TXNIP* nas células linfomononucleares de sangue periférico dos pacientes DM1 em relação aos controles. Esse achado corrobora achados prévios que documentam o desbalanço redox dos pacientes com DM, que já foi demonstrado com a utilização de outros marcadores de estresse oxidativo (85, 86), mas nunca havia sido mostrado com a expressão de *TXNIP*.

As estratificações dos pacientes de acordo com a EUA e com a TFGe não revelaram diferenças significantes entre os grupos, o que também aconteceu quando os pacientes foram estratificados de acordo com os estágios de retinopatia diabética e de neuropatia autonômica cardiovascular, também avaliados por nosso grupo de estudo (dados não mostrados). Esses achados provavelmente indicam que a expressão de *TXNIP* nas células linfomononucleares de sangue periférico é afetada pelas anormalidades metabólicas que cursam com o DM1, mas não refletem a presença das complicações microvasculares.

A expressão da TXN, proteína que é inibida pela TXNIP, não foi diferente nas análises em sedimento urinário de portadores de DM1, GESF e controles. No entanto, dentre os pacientes com DM1, observou-se uma maior expressão de TXN nos pacientes com TFG_e <60 em relação àqueles com TFG_e ≥60 mL/min/1,73m². Também se observou uma correlação inversa entre a expressão de TXN no sedimento urinário e a TFG_e. Inicialmente, este achado nos pareceu paradoxal, uma vez que a expressão de uma molécula que participa das defesas antioxidantes estava mais alta nos estágios mais avançados da ND. No entanto, deve-se levar em consideração que, além de sua atividade antioxidante, a TXN exerce múltiplos efeitos como molécula de sinalização. Por exemplo, há descrições de que a TXN, localizada primordialmente no citoplasma, é translocada para o núcleo mediante sinais de estresse como H₂O₂, óxido nítrico, radiação ultravioleta e infecções virais (87-89). No núcleo ela é capaz de estimular a ativação de inúmeros fatores de transcrição, incluindo NF-κB (90, 91).

Existem poucos estudos na literatura abordando o papel de TXN na injúria renal; dois estudos em isquemia-reperfusão em rins de ratos demonstraram aumento da excreção urinária de TXN 12 horas após isquemia (92). Os mesmos autores mostraram que o aumento de TXN na urina após a isquemia-reperfusão não é mediado pela indução *de novo* da transcrição de TXN, mas uma por uma descarga de TXN de células epiteliais tubulares (93).

Um artigo recentemente publicado avaliou a proteína TXN na urina em pacientes com DRC associada ou não ao DM. Nos portadores de DM2

avaliados, a TXN urinária correlacionou-se negativamente com a TFGe e positivamente com a EUA. Nos portadores de DRC não diabética, observou-se apenas uma correlação entre a TXN urinária e a EUA nos pacientes do sexo masculino (94). Em nosso estudo, avaliando não a proteína, mas o mRNA, também observamos uma correlação negativa entre a expressão desta proteína e a TFGe, corroborando a participação da TXN na ND.

Já nas células linfomononucleares observou-se aumento da expressão de *TXN* nos portadores de DM1 em relação aos controles. Não houve diferença da expressão desse gene nos diferentes estágios da doença renal. Da mesma forma que discutido para o sedimento urinário, inicialmente nos pareceu paradoxal a expressão aumentada de *TXN* nos portadores de DM1, no entanto, já foi demonstrado aumento da expressão de *TXN* em células linfomononucleares de portadores de Síndrome metabólica após ingestão de refeição rica em ácidos graxos saturados, concomitantemente ao aumento de expressão de subunidades da NADPH oxidase (95), mostrando que em situações de estresse oxidativo pode haver um aumento da expressão de *TXN* como um mecanismo de proteção contra o insulto oxidativo (96). Também observou-se uma correlação positiva entre a expressão de *TXN* e de *TXNIP* nos pacientes DM1. Resultado similar foi descrito em um estudo em endometriose que demonstrou uma correlação positiva entre a expressão de *TXN* e *TXNIP* em tecido endometrial na população controle (97). Não encontramos nenhum trabalho na literatura que correlacionasse estes dois genes em células linfomononucleares ou mesmo em leucócito total. Alguns poucos trabalhos mostraram uma

correlação negativa entre a expressão gênica e protéica de TXN e TXNIP (98, 99). Ambos os trabalhos foram realizados em câncer. Em nosso estudo não analisamos a expressão protéica desses genes, portanto não é possível dizer se, de fato, o aumento da expressão de *TXNIP* está se traduzindo em maior expressão protéica e inibição de TXN.

Em relação à expressão do gene *SLC19A2*, que codifica o transportador de tiamina THTR1, ela mostrou-se aumentada no sedimento urinário dos pacientes DM1 e GESF em relação aos controles. Além disso, também mostramos seu aumento no sedimento de pacientes DM1 com ND e também naqueles com TFGe $<60 \text{ mL/min/1,73m}^2$. Já nas células linfomononucleares, não observamos diferença na expressão desse transportador nos portadores de DM1, nem em relação aos controles, nem entre aqueles com diferentes graus de doença renal.

Na literatura, um aumento do *clearance* de tiamina foi demonstrado em ratos com DM induzido por estreptozotocina e em pacientes com DM1 e DM2 (40, 100). Também se demonstrou aumento da expressão do transportador THTR1 nos eritrócitos de portadores de DM e em células linfomononucleares dos pacientes DM1 e DM2, acredita-se, em resposta à deficiência de tiamina (45), o que não observamos no presente estudo.

Já em células de túbulo proximal humanas isoladas de indivíduos saudáveis mantidas em cultura, o grupo de Paul J. Thornalley demonstrou uma diminuição da expressão dos transportadores THTR1 e THTR2 após exposição a altas concentrações de glicose (25 mM) em relação a concentrações fisiológicas (5 mM) após cinco dias de incubação (44). Esse

achado *in vitro* explicaria porque indivíduos com DM apresentam um *clearance* de tiamina aumentado: não reabsorção da tiamina filtrada por menor expressão dos transportadores responsáveis pela reabsorção no túbulo proximal.

Nossos achados no sedimento urinário de expressão aumentada, e não reduzida, do gene *SLC19A2* em pacientes DM1 com ND e com redução da TFG_e, porém, não corroboram a hipótese de perda urinária de tiamina por menor expressão do THTR1, embora a exiguidade de material obtido de sedimento urinário não permita uma conclusão definitiva pelo estudo da proteína THTR1. É importante ressaltar, também, que o estudo de Thornalley avalia a expressão do THTR1 em células tubulares, enquanto nosso estudo é realizado em um *pool* de células presentes no sedimento urinário, que contém não apenas células tubulares proximais, mas possivelmente células tubulares de outros segmentos, podócitos e até mesmo alguns leucócitos.

Como forma de avaliar o *status* tiamínico dos pacientes DM1 de nossa casuística, e testarmos a hipótese de que o aumento da expressão do THTR1 seria secundário à deficiência de tiamina, realizamos a quantificação de tiamina plasmática nos portadores de DM1 e nos indivíduos controle. Os resultados mostraram que apesar de estarem dentro da faixa de normalidade, as concentrações de tiamina nos pacientes DM1 são significativamente mais baixas que a dos indivíduos controles. Além disso, essa diferença pode ser observada nos pacientes em todas as faixas de EUA mostrando, portanto, que a função renal não parece ser fator decisivo

para as menores concentrações circulantes de tiamina nos pacientes DM1 da presente casuística. Apesar dessa diferença, não observamos uma diminuição tão significativa quanto a demonstrada pelo grupo de Thornalley em pacientes DM1 (45). Alguns trabalhos, no entanto, mostraram diferenças pouco importantes (101). Em pacientes com DM (tipo não especificado) foram observadas concentrações plasmáticas de $46,9 \pm 28,5$ ng/ml (42), valores próximos ao encontrados em nosso estudo.

A redução das concentrações plasmáticas de tiamina nos portadores de DM1 em relação à população controle não determinou um aumento na expressão do RNA dos transportadores de tiamina nas células linfomononucleares, por isso, acreditamos que não seja possível concluir que o aumento da expressão do mRNA de THTR1 observado no sedimento urinário poderia ser uma resposta celular global à diminuição das concentrações de tiamina.

Nossos achados de aumento da expressão do mRNA de THTR1 no sedimento urinário não parecem corroborar a hipótese de Thornalley de que a deficiência de tiamina nos portadores de DM1 se estabelece pelo aumento do *clearance* renal de tiamina devido à menor expressão de THTR1 e THTR2 nas células tubulares proximais. Em nossos experimentos com as células HEK293, sem suplementação com tiamina, não observamos modulação da expressão desse transportador após os tratamentos com glicose e com albumina controle e albumina AGE. Dentro deste contexto, procuramos achar explicações adicionais que pudessem justificar o *clearance* renal aumentado de tiamina em pacientes diabéticos na ausência

de diminuição da expressão dos transportadores de tiamina nas células tubulares renais. Encontramos o estudo de Verri e cols. (2002), que avaliou as características moleculares dos transportadores de tiamina do intestino e do rim e descreveu que o fenilglioxal, um AGE que reage com resíduos arginina, foi capaz de diminuir o transporte de tiamina apenas nas células renais, por modificar quimicamente a estrutura do transportador (102).

Já para o transportador THTR2, foram encontrados valores muito baixos de expressão nas amostras estudadas. Apesar da expressão tanto de THTR1 como de THTR2 ter sido demonstrada em cultura de células tubulares epiteliais de seres humanos, experimentos de imunomarcacão mostraram a predominância do transportador do tipo 1 em relação ao tipo 2 no tecido renal humano (44) provavelmente devido ao fato do primeiro localizar-se nas membranas apical e basolateral tubular, enquanto que o segundo localiza-se apenas na membrana basolateral. Também deve contribuir o fato de trabalharmos com massa de apenas 10 ng de cDNA por reação, devido a escassez de nosso material de pesquisa. Além disso, em células HEK293 já foi demonstrada a predominância do transportador do tipo 1 em relação ao tipo 2 (103).

A proteína beta 2 microglobulina, codificada pelo gene *B2M*, é bem conhecida em nefrologia pelo aumento de suas concentrações séricas em paralelo com a queda da TFG_e; por sua participação na amiloidose associada a hemodiálise (49) e por suas altas concentrações urinárias terem sido propostas como um marcador de lesão tubular proximal (48). Além disso, concentrações elevadas de B2M já foram associadas com aumento

da mortalidade em pacientes com DRC (51), DM (52), e até na população geral (53), o que tem sido atribuído a sua capacidade de provocar inflamação (54). Apesar do conhecimento relacionado à B2M sistêmica, pouco é sabido sobre a sua expressão renal.

Tem sido demonstrado que a B2M estimula monócitos a secretar citocinas pró-inflamatórias, tais como factor de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8 e IL-10 (104), e que várias citocinas podem aumentar a expressão de B2M em macrófagos (105), possivelmente constituindo um ciclo vicioso. Como a inflamação desempenha um importante papel na tubulopatia diabética (19), é plausível especular que os nossos resultados de aumento da expressão de *B2M* no sedimento urinário de pacientes com ND possa refletir a extensão da lesão túbulo-intersticial nestes pacientes.

Os achados de que nos participantes com TFGe ≥ 60 mL/min/1,73m², os níveis de expressão de *B2M* foram mais elevados naqueles com ND estabelecida *versus* participantes sem ND, enquanto que a estratificação por TFGe em participantes com ND não resultou em diferenças significativas sugere que a expressão aumentada de *B2M* deve refletir mais a exposição de células tubulares renais a albuminúria do que a função glomerular. No entanto, não podemos excluir células glomerulares como uma fonte de aumento da expressão de B2M uma vez que o mRNA de podocina detectado no sedimento urinário.

A expressão aumentada de *B2M* poderia advir de células inflamatórias ou das próprias células tubulares proximais. Falando a favor da

expressão nas células tubulares, observou-se que células HEK293 tratadas com glicose e albumina-AGE apresentaram aumento da expressão de *B2M*. Esses dados vão ao encontro de achados prévios de aumento da expressão de *B2M* na retina de camundongos diabéticos (106) e sugerem que a hiperglicemia e proteínas modificadas por glicação avançada estão implicadas no aumento da expressão de *B2M* em células-alvo de complicações do DM.

O único estudo prévio que mediu a expressão de *B2M* no sedimento urinário para a avaliação da doença renal incluiu pacientes com DRC (etiologia não mencionada) em diferentes estágios, que apresentavam deterioração aguda da função renal, com o objetivo de procurar biomarcadores não invasivos da lesão renal (107). Embora a expressão de *B2M* não tenha se correlacionado com o grau de recuperação da função renal no período de estudo, demonstrou-se uma correlação negativa entre a expressão de *B2M* e a TFG_e na população em geral (composta por dois terços de pacientes do sexo masculino) (107). Esse resultado se assemelha ao encontrado no presente estudo para os pacientes do sexo masculino, sugerindo algum dimorfismo sexual no padrão de expressão de *B2M* no rim de pacientes com DM. É interessante observar que uma correlação negativa com o sexo masculino também foi observada com a expressão dos genes *TXNIP* e *SLC19A2* no sedimento urinário. Esses achados estão em consonância com a ideia de que as diferenças de expressão gênica relacionadas ao sexo em tecidos somáticos podem causar diferenças

fenotípicas no sexo masculino e feminino, tais como a progressão mais rápida de doenças renais em homens do que em mulheres (108).

As maiores limitações desse estudo foram aquelas relacionadas às dificuldades intrínsecas no trabalho com sedimento urinário, como o pequeno número de pacientes com mRNA de boa qualidade: amostras de urina foram coletadas de 212 pacientes com DM1, 25 pacientes com GESF e 70 controles para obtermos a casuística aqui apresentada. Além disso, a quantidade limitada de material impediu a análise da expressão protéica e a definição precisa dos tipos celulares que promovem o aumento da expressão gênica dos mRNAs avaliados. Apesar disso, a expressão dos genes codificantes de SGLT2 e podocina indicam que células tubulares proximais e podócitos estão presentes no sedimento. Por outro lado, a concordância de nossos resultados com os de outros dois estudos prévios nos mostra que o método de obtenção e análise do mRNA de sedimento foram empregados de maneira correta: a correlação inversa entre a expressão de *B2M* e a TFG_e (107) e a correlação positiva entre a expressão de *NPHS2* (podocina) e a EUA (109).

Nossos resultados confirmam, no cenário clínico, a participação da TXNIP na patogênese da doença renal diabética e, adicionalmente, sugerem a participação da TXN e da B2M.

6. CONCLUSÕES

- A expressão de *TXNIP* está aumentada no sedimento urinário de portadores de DM1 e de portadores de GESF;
- Em portadores de DM1, a expressão de *TXNIP* está aumentada em presença de doença renal diabética e associa-se com a magnitude do declínio da TFGe;
- A expressão de *TXN* está aumentada no sedimento urinário de portadores de DM1 com TFGe $<60 \text{ mL/min/1,73m}^2$;
- A expressão de *TXNIP* e de *TXN* está aumentada nas células linfomononucleares de portadores de DM1;
- A expressão de *SLC19A2* está aumentada no sedimento urinário de portadores de DM1 e de portadores de GESF;
- Em portadores de DM1, a expressão de *SLC19A2* está aumentada em presença de doença renal diabética;
- Em portadores de DM1, a expressão de *B2M* está aumentada em presença de doença renal diabética.

7. REFERÊNCIAS

1. American Diabetes Association. Diabetes statistics for Youth 2004 [Available from: <http://www.diabetes.org/utills/printthispage.jsp>.
2. Onkamo P, Väänänen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia*. 1999;42(12):1395-403.
3. Walsh MG, Zgibor J, Borch-Johnsen K, Orchard TJ, Investigators D. A multinational comparison of complications assessment in type 1 diabetes: the DiaMond substudy of complications (DiaComp) level 2. *Diabetes Care*. 2004;27(7):1610-7.
4. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complication. *Nature*. 2001;414:813-20.
5. Kostolanská J, Jakus V, Barák L. HbA1c and serum levels of advanced glycation and oxidation protein products in poorly and well controlled children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2009;22(5):433-42.
6. Codoñer-Franch P, Pons-Morales S, Boix-García L, Valls-Bellés V. Oxidant/antioxidant status in obese children compared to pediatric patients with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*. 2010;11(4):251-7.
7. Ceriello A, Morocutti A, Mercuri F, Quagliaro L, Moro M, Damante G, et al. Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes*. 2000;49(12):2170-7.
8. Hodgkinson AD, Bartlett T, Oates PJ, Millward BA, Demaine AG. The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2003;52(3):846-51.
9. Gilbertson DT, Liu J, Xue JL, Louis TA, Solid CA, Ebben JP, et al. Projecting the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2015. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(12):3736-41.
10. Brownlee M, Aiello LP, Friedman E, Vinik AI, Nesto RW, Boulton AJM. Complications of Diabetes Mellitus. *Williams textbook of endocrinology*. 10th ed: Philadelphia: Saunders; 2003.
11. Ficociello LH, Perkins BA, Roshan B, Weinberg JM, Aschengrau A, Warram JH, et al. Renal hyperfiltration and the development of microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(5):889-93.
12. Inzucchi SE. *Diabete melito: manual de cuidados essenciais*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.
13. Zatz R. *Fisiopatologia Renal*. 2a. edição ed. Silva MR, editor. São Paulo: Atheneu; 2002.
14. Perkins BA, Krolewski AS. Early nephropathy in type 1 diabetes: the importance of early renal function decline. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009;18(3):233-40.

15. Costacou T, Ellis D, Fried L, Orchard TJ. Sequence of progression of albuminuria and decreased GFR in persons with type 1 diabetes: a cohort study. *Am J Kidney Dis*. 2007;50(5):721-32.
16. Morcos M, Sayed AA, Bierhaus A, Yard B, Waldherr R, Merz W, et al. Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2002;51(12):3532-44.
17. Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis*. 1992;20(1):1-17.
18. Benigni A, Zoja C, Remuzzi G. The renal toxicity of sustained glomerular protein traffic. *Lab Invest*. 1995;73(4):461-8.
19. Tang SC, Leung JC, Lai KN. Diabetic tubulopathy: an emerging entity. *Contrib Nephrol*. 2011;170:124-34.
20. Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, et al. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med*. 1991;325(12):836-42.
21. Hagiwara S, McClelland A, Kantharidis P, Hagiwara S, McClelland A, Kantharidis P. MicroRNA in Diabetic Nephropathy: Renin Angiotensin, AGE/RAGE, and Oxidative Stress Pathway. *Journal of Diabetes Research*. 2013;2013:2013.
22. Banba N, Nakamura T, Matsumura M, Kuroda H, Hattori Y, Kasai K. Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2000;58(2):684-90.
23. Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, Takeuchi M, et al. Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells. *J Biol Chem*. 2002;277(23):20309-15.
24. Yamagishi S, Fukami K, Ueda S, Okuda S. Molecular mechanisms of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention. *Curr Drug Targets*. 2007;8(8):952-9.
25. Chiarelli F, Cipollone F, Mohn A, Marini M, Iezzi A, Fazia M, et al. Circulating monocyte chemoattractant protein-1 and early development of nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2002;25(10):1829-34.
26. Fukami K, Ueda S, Yamagishi S, Kato S, Inagaki Y, Takeuchi M, et al. AGEs activate mesangial TGF-beta-Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction. *Kidney Int*. 2004;66(6):2137-47.
27. Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, Takeuchi M. Advanced glycation end products inhibit de novo protein synthesis and induce TGF-beta overexpression in proximal tubular cells. *Kidney Int*. 2003;63(2):464-73.
28. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
29. Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(11):1287-312.

30. Maulik N, Das DK. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(11):1368-82.
31. Chen KS, DeLuca HF. Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1219(1):26-32.
32. Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, Hirota K, Masutani H, Nakamura H, et al. Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21645-50.
33. Parikh H, Carlsson E, Chutkow WA, Johansson LE, Storgaard H, Poulsen P, et al. TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans. *PLoS Med*. 2007;4(5):e158.
34. Chen J, Saxena G, Mungrue IN, Lusis AJ, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis. *Diabetes*. 2008;57(4):938-44.
35. Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science*. 2010;327(5963):296-300.
36. Kobayashi T, Uehara S, Ikeda T, Itadani H, Kotani H. Vitamin D3 up-regulated protein-1 regulates collagen expression in mesangial cells. *Kidney Int*. 2003;64(5):1632-42.
37. Qi W, Chen X, Gilbert RE, Zhang Y, Waltham M, Schache M, et al. High glucose-induced thioredoxin-interacting protein in renal proximal tubule cells is independent of transforming growth factor-beta1. *Am J Pathol*. 2007;171(3):744-54.
38. Advani A, Gilbert RE, Thai K, Gow RM, Langham RG, Cox AJ, et al. Expression, localization, and function of the thioredoxin system in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(4):730-41.
39. Rabbani N, PJ T. Thiamine deficiency and renal function in diabetes. In: PJ T, P K, editors. *Complications of Diabetes Mellitus: Pathophysiology and Pathogenetically-based Treatment Options*. Rome, Italy: Thieme; 2009. p. 18-25.
40. Babaei-Jadidi R, Karachalias N, Kupich C, Ahmed N, Thornalley P. High-dose thiamine therapy counters dyslipidaemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*. 2004;47(12):2235-46.
41. HAUGEN HN. THE BLOOD CONCENTRATION OF THIAMINE IN DIABETES. *Scand J Clin Lab Invest*. 1964;16:260-6.
42. Saito N, Kimura M, Kuchiba A, Itokawa Y. Blood thiamine levels in outpatients with diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1987;33(6):421-30.
43. Thornalley PJ, Babaei-Jadidi R, Al Ali H, Rabbani N, Antonysunil A, Larkin J, et al. High prevalence of low plasma thiamine concentration in diabetes linked to a marker of vascular disease. *Diabetologia*. 2007;50(10):2164-70.
44. Larkin JR, Zhang F, Godfrey L, Molostvov G, Zehnder D, Rabbani N, et al. Glucose-induced down regulation of thiamine transporters in the kidney proximal tubular epithelium produces thiamine insufficiency in diabetes. *PLoS One*. 2012;7(12):e53175.

45. Thornalley P, Babaei-Jadidi R, Al Ali H, Rabbani N, Antonysunil A, Larkin J, et al. High prevalence of low plasma thiamine concentration in diabetes linked to a marker of vascular disease. *Diabetologia*. 2007;50(10):2164-70.
46. Reidling JC, Said HM. In vitro and in vivo characterization of the minimal promoter region of the human thiamin transporter SLC19A2. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285(3):C633-41.
47. Adaikalakoteswari A, Perkins B, Krolewski A, Rabbani N, Thornalley P. Thiamine status and risk of early renal function decline in type 1 diabetic patients. 2008.
48. Miyata T, Jadoul M, Kurokawa K, Van Ypersele de Strihou C. Beta-2 microglobulin in renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(9):1723-35.
49. Drüeke TB, Massy ZA. Beta2-microglobulin. *Semin Dial*. 2009;22(4):378-80.
50. Tomlinson PA. Low molecular weight proteins in children with renal disease. *Pediatr Nephrol*. 1992;6(6):565-71.
51. Liabeuf S, Lenglet A, Desjardins L, Neiryneck N, Glorieux G, Lemke HD, et al. Plasma beta-2 microglobulin is associated with cardiovascular disease in uremic patients. *Kidney Int*. 2012;82(12):1297-303.
52. Cheung CL, Lam KS, Cheung BM. Serum β -2 microglobulin predicts mortality in people with diabetes. *Eur J Endocrinol*. 2013;169(1):1-7.
53. Astor BC, Shafi T, Hoogeveen RC, Matsushita K, Ballantyne CM, Inker LA, et al. Novel markers of kidney function as predictors of ESRD, cardiovascular disease, and mortality in the general population. *Am J Kidney Dis*. 2012;59(5):653-62.
54. Chen NX, O'Neill KD, Niwa T, Moe SM. Signal transduction of beta2m-induced expression of VCAM-1 and COX-2 in synovial fibroblasts. *Kidney Int*. 2002;61(2):414-24.
55. Macisaac RJ, Ekinci EI, Jerums G. Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2014;63(2 Suppl 2):S39-62.
56. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2004;27 Suppl 1:S5-S10.
57. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:77-89.
58. Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Kwan CH, Li KT, et al. Urinary mRNA expression of ACE and ACE2 in human type 2 diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2008;51(6):1062-7.
59. Szeto CC, Chan RW, Lai KB, Szeto CY, Chow KM, Li PK, et al. Messenger RNA expression of target genes in the urinary sediment of patients with chronic kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(1):105-13.
60. Zheng M, Lv LL, Cao YH, Liu H, Ni J, Dai HY, et al. A pilot trial assessing urinary gene expression profiling with an mRNA array for diabetic nephropathy. *PLoS One*. 2012;7(5):e34824.

61. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
62. Gross J, de Azevedo M, Silveiro S, Canani L, Caramori M, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care*. 2005;28(1):164-76.
63. Lin CL, Wang FS, Hsu YC, Chen CN, Tseng MJ, Saleem MA, et al. Modulation of notch-1 signaling alleviates vascular endothelial growth factor-mediated diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2010;59(8):1915-25.
64. Cai W, He JC, Zhu L, Lu C, Vlassara H. Advanced glycation end product (AGE) receptor 1 suppresses cell oxidant stress and activation signaling via EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(37):13801-6.
65. Qi W, Chen X, Holian J, Tan CY, Kelly DJ, Pollock CA. Transcription factors Krüppel-like factor 6 and peroxisome proliferator-activated receptor- γ mediate high glucose-induced thioredoxin-interacting protein. *Am J Pathol*. 2009;175(5):1858-67.
66. Machado AP, Pinto RS, Moysés ZP, Nakandakare ER, Quintão EC, Passarelli M. Aminoguanidine and metformin prevent the reduced rate of HDL-mediated cell cholesterol efflux induced by formation of advanced glycation end products. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(3):392-403.
67. Dumauval CM, Steere BA, Walls CD, Wang M, Zhang ZY, Randall SK. Integrated analysis of global mRNA and protein expression data in HEK293 cells overexpressing PRL-1. *PLoS One*. 2013;8(9):e72977.
68. 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.
69. Webb GC, Vaska VL, Gali RR, Ford JH, Board PG. The gene encoding human glutathione synthetase (GSS) maps to the long arm of chromosome 20 at band 11.2. *Genomics*. 1995;30:617-19.
70. Tang SC, Chan LY, Leung JC, Cheng AS, Chan KW, Lan HY, et al. Bradykinin and high glucose promote renal tubular inflammation. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(3):698-710.
71. Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, Brown J. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes*. 2005;54(12):3427-34.
72. Chen A, Ka SC, inventors Sglt2 as biomarker for diagnosing chronic kidney disease and monitoring the disease status after treatment 2015.
73. Hamada Y, Fukagawa M. A possible role of thioredoxin interacting protein in the pathogenesis of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Kobe J Med Sci*. 2007;53(1-2):53-61.
74. Shi Y, Ren Y, Zhao L, Du C, Wang Y, Zhang Y, et al. Knockdown of thioredoxin interacting protein attenuates high glucose-induced apoptosis and activation of ASK1 in mouse mesangial cells. *FEBS Lett*. 2011;585(12):1789-95.

75. Wei J, Shi Y, Hou Y, Ren Y, Du C, Zhang L, et al. Knockdown of thioredoxin-interacting protein ameliorates high glucose-induced epithelial to mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *Cell Signal*. 2013;25(12):2788-96.
76. Abais JM, Xia M, Li G, Chen Y, Conley SM, Gehr TW, et al. Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome activation and podocyte injury via thioredoxin-interacting protein (TXNIP) during hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem*. 2014;289(39):27159-68.
77. Gao K, Chi Y, Sun W, Takeda M, Yao J. 5'-AMP-activated protein kinase attenuates adriamycin-induced oxidative podocyte injury through thioredoxin-mediated suppression of the apoptosis signal-regulating kinase 1-P38 signaling pathway. *Mol Pharmacol*. 2014;85(3):460-71.
78. Joshi S, Wang W, Peck AB, Khan SR. Activation of the NLRP3 Inflammasome in Association with Calcium Oxalate Crystal Induced Reactive Oxygen Species in Kidneys. *J Urol*. 2015;193(5):1684-91.
79. Wang W, Ding XQ, Gu TT, Song L, Li JM, Xue QC, et al. Pterostilbene and allopurinol reduce fructose-induced podocyte oxidative stress and inflammation via microRNA-377. *Free Radic Biol Med*. 2015;83:214-26.
80. Yang SM, Hua KF, Lin YC, Chen A, Chang JM, Kuoping Chao L, et al. Citral is renoprotective for focal segmental glomerulosclerosis by inhibiting oxidative stress and apoptosis and activating Nrf2 pathway in mice. *PLoS One*. 2013;8(9):e74871.
81. Huang C, Lin MZ, Cheng D, Braet F, Pollock CA, Chen XM. Thioredoxin-interacting protein mediates dysfunction of tubular autophagy in diabetic kidneys through inhibiting autophagic flux. *Lab Invest*. 2014;94(3):309-20.
82. Vlassara H, Striker GE. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(9):526-39.
83. Perrone L, Devi TS, Hosoya K, Terasaki T, Singh LP. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) induces inflammation through chromatin modification in retinal capillary endothelial cells under diabetic conditions. *J Cell Physiol*. 2009;221(1):262-72.
84. Sbai O, Devi TS, Melone MA, Feron F, Khrestchatisky M, Singh LP, et al. RAGE-TXNIP axis is required for S100B-promoted Schwann cell migration, fibronectin expression and cytokine secretion. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 24):4332-9.
85. Varvarovska J, Racek J, Stozicky F, Soucek J, Trefil L, Pomahacova R. Parameters of oxidative stress in children with type 1 diabetes mellitus and their relatives. *J Diabetes Complications*. 2003;17:7-10.
86. Martín-Gallán P, Carrascosa A, Gussinyé M, Domínguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(12):1563-74.
87. Arai RJ, Masutani H, Yodoi J, Debbas V, Laurindo FR, Stern A, et al. Nitric oxide induces thioredoxin-1 nuclear translocation: possible association with the p21Ras survival pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;348(4):1254-60.
88. Schroeder P, Popp R, Wiegand B, Altschmied J, Haendeler J. Nuclear redox-signaling is essential for apoptosis inhibition in endothelial cells--important role for nuclear thioredoxin-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(11):2325-31.

89. Go YM, Kang SM, Roede JR, Orr M, Jones DP. Increased inflammatory signaling and lethality of influenza H1N1 by nuclear thioredoxin-1. *PLoS One*. 2011;6(4):e18918.
90. Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, et al. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem*. 1999;274(39):27891-7.
91. Toledano MB, Leonard WJ. Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(10):4328-32.
92. Kasuno K, Nakamura H, Ono T, Muso E, Yodoi J. Protective roles of thioredoxin, a redox-regulating protein, in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int*. 2003;64(4):1273-82.
93. Kasuno K, Kimura H, Takahashi N, Mikami D, Yokoyama Y, Nobukawa Y, et al. [Clinical application of urinary redox regulating protein, thioredoxin]. *Rinsho Byori*. 2011;59(2):189-95.
94. Tobino K, Muso E, Iwasaki Y, Yonemoto S, Kasuno K, Tsukamoto T, et al. Gender- and disease-specific urinary thioredoxin in chronic kidney disease patients with or without type 2 diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. 2015;20(5):368-74.
95. Camargo A, Peña-Orihuela P, Rangel-Zúñiga OA, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, Cruz-Teno C, et al. Peripheral blood mononuclear cells as in vivo model for dietary intervention induced systemic oxidative stress. *Food Chem Toxicol*. 2014;72:178-86.
96. World C, Spindel ON, Berk BC. Thioredoxin-interacting protein mediates TRX1 translocation to the plasma membrane in response to tumor necrosis factor- α : a key mechanism for vascular endothelial growth factor receptor-2 transactivation by reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(8):1890-7.
97. Seo SK, Yang HI, Lee KE, Kim HY, Cho S, Choi YS, et al. The roles of thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in endometriosis. *Hum Reprod*. 2010;25(5):1251-8.
98. Lim JY, Yoon SO, Hong SW, Kim JW, Choi SH, Cho JY. Thioredoxin and thioredoxin-interacting protein as prognostic markers for gastric cancer recurrence. *World J Gastroenterol*. 2012;18(39):5581-8.
99. Baker AF, Koh MY, Williams RR, James B, Wang H, Tate WR, et al. Identification of thioredoxin-interacting protein 1 as a hypoxia-inducible factor 1 α -induced gene in pancreatic cancer. *Pancreas*. 2008;36(2):178-86.
100. Babaei-Jadidi R, Karachalias N, Ahmed N, Battah S, Thornalley P. Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. *Diabetes*. 2003;52(8):2110-20.
101. Hobara R, Ozawa K, Okazaki M, Yasuhara H. Relationship between thiamine and glucose levels in diabetes mellitus. *Jpn J Pharmacol*. 1981;31(6):1098-100.
102. Verri A, Laforenza U, Gastaldi G, Tosco M, Rindi G. Molecular characteristics of small intestinal and renal brush border thiamin transporters in rats. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1558(2):187-97.

103. Ashokkumar B, Vaziri ND, Said HM. Thiamin uptake by the human-derived renal epithelial (HEK-293) cells: cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;291(4):F796-805.
104. Xie J, Yi Q. Beta2-microglobulin as a potential initiator of inflammatory responses. *Trends Immunol*. 2003;24(5):228-9; author reply 9-30.
105. Nachbaur K, Troppmair J, Bieling P, Kotlan B, König P, Huber C. Cytokines in the control of beta-2 microglobulin release. I. In vitro studies on various haemopoietic cells. *Immunobiology*. 1988;177(1):55-65.
106. Freeman WM, Bixler GV, Brucklacher RM, Walsh E, Kimball SR, Jefferson LS, et al. Transcriptomic comparison of the retina in two mouse models of diabetes. *J Ocul Biol Dis Infor*. 2009;2(4):202-13.
107. Luk CC, Chow KM, Kwok JS, Kwan BC, Chan MH, Lai KB, et al. Urinary biomarkers for the prediction of reversibility in acute-on-chronic renal failure. *Dis Markers*. 2013;34(3):179-85.
108. Rinn JL, Snyder M. Sexual dimorphism in mammalian gene expression. *Trends Genet*. 2005;21(5):298-305.
109. Zheng M, Lv LL, Ni J, Ni HF, Li Q, Ma KL, et al. Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. *PLoS One*. 2011;6(5):e20431.

Anexo 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

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 :SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Expressão do RNA mensageiro dos genes *TXNIP*, *SCL19A2* e *SCL19A3* no sedimento urinário de portadores de diabetes mellitus tipo 1 com e sem nefropatia diabética

PESQUISADOR: Profa. Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella

CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente e Professora Pesquisadora INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 62926

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

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável.....

Rubrica do pesquisador.....

4.DURAÇÃO DA PESQUISA: 15/12/2012 a 30/06/2016

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

O diabetes melito tipo é uma doença que se caracteriza por aumento da glicemia (açúcar no sangue). Há vários tipos de diabetes: algumas pessoas têm maior risco de desenvolver diabetes do que outras, principalmente as que tem parentes com diabetes. Em outras famílias, a frequência de diabetes é tão alta que é quase certo que a maior parte dos filhos terão diabetes. Às vezes, no entanto, o acometimento familiar é relativamente raro. Além disso, o descontrole do diabetes por longo tempo pode levar ao desenvolvimento de outras doenças como diminuição ou perda da visão, problemas nos rins e nos nervos. Convidamos o(a) Senhor(a) a participar de uma pesquisa que tem por objetivo identificar um marcador que possa ser medido na urina e possa prevenir o desenvolvimento de problemas nos rins associados ao seu diabetes.

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, vamos colher uma amostra de sua urina para a extração do material genético (RNA). Este material será usado no estudo de marcadores de problemas nos rins que possam ser testados na urina, sem a necessidade de se fazer biópsia (retirar um pequeno pedaço do rim para exame).

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de urina em tubo plástico estéril

Somente será realizada a coleta de urina para obtenção de material genético. Em uma pequena parte da urina, aproximadamente 10ml, será submetido a um exame de Urina tipo 1, usado para checar se o(a) Sr(a). está com infecção urinária. Caso esteja com infecção sua amostra será descartada e colheremos uma nova amostra outro dia, caso o(a) Sr(a) concorde.

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

Não haverá nenhum desconforto para o (a) Sr (a). Será exatamente como colher urina para qualquer outro tipo de exame. Não há riscos neste procedimento.

5 – Benefícios para o participante

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Não há benefício direto para o participante. Existe a possibilidade de que após a realização desse estudo, sejam identificados marcadores que possam ser usados para detectar doença nos rins. Com isso, no futuro, poderemos diagnosticar e tratar com precisão os portadores de diabetes que comecem a desenvolver doença renal sem a necessidade de biópsia, ou seja, não haverá necessidade de retirar um pedaço do rim para fazer os exames.

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

Como a coleta de urina 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 doar a urina.

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) 3061-7467. 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 ou 18, FAX: 2661-6442 ramal 26 – 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 doença renal. 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 pois a coleta de urina será realizada no mesmo dia que o (a) Sr (a) vier para a consulta médica. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

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

A amostra de urina cedida pelo(a) Sr(a) poderá ser utilizada em outras pesquisas que também tenham o objetivo de prevenir ou estudar as doenças dos rins. Para que sua amostra possa ser armazenada e usada em outras pesquisas é necessária sua autorização. Por favor, informe abaixo a necessidade de consultá-lo(a) para autorizar o uso do seu material biológico (amostra de urina) 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 estudo “Expressão do RNA mensageiro dos genes *TXNIP*, *SCL 19A2* e *SCL 19A3* no sedimento urinário de portadores de diabetes mellitus tipo 1 com e sem nefropatia diabética”

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Assinatura da testemunha _____ Data ____ / ____ / ____

(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 pesquisador_____

Anexo 2

Aprovação e Adendo do Comitê de Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa – CAPPesq do HCFMUSP

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: 9409	Data de Entrada: 28/05/2012

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

1. Título do Protocolo de Pesquisa

Expressão do RNA mensageiro dos genes TXNIP, SCL19A2 e SCL19A3 no sedimento urinário de portadores de diabetes mellitus tipo 1 com e sem nefropatia

diabética

2. Palavras-chaves que caracterizam o assunto da Pesquisa

Diabetes mellitus tipo 1, sedimento urinário, nefropatia diabética

3. Resumo do Protocolo de Pesquisa:

A nefropatia diabética (ND) é classicamente dividida em cinco estágios, com as seguintes características: 1) hiperfiltração glomerular; 2) excreção urinária de albumina (EUA) normal; 3) ND incipiente com microalbuminúria persistente; 4) ND franca caracterizada por proteinúria e queda da taxa de filtração glomerular (TFG) e 5) doença renal terminal. Vários estudos tem mostrado, entretanto, que a EUA e o declínio da função renal podem não evoluir de forma paralela e que a TFG pode diminuir na ausência de EUA anormal. Além disso, evidências recentes sugerem que em pacientes com doença renal crônica (DRC), a extensão da disfunção renal parece correlacionar-se melhor com a lesão tubulointersticial do que com glomerulopatia. É sabido que as concentrações de marcadores do estresse oxidativo estão aumentadas em pacientes com diabetes mellitus (DM). O sistema tiorredoxina (Trx) é um dos principais sistemas antioxidantes endógenos. A Trx é capaz de interagir com um grande número de fatores de transcrição e proteínas, tal como a Trx interacting protein (TXNIP). Recentemente, a participação da TXNIP tem sido reconhecida na patogênese do DM e de suas complicações. A deficiência de tiamina, ou vitamina B1, já foi relatada em modelos experimentais de DM, concomitantemente a um aumento de seu clearance renal. O transportador de tiamina 1 (THTR-1), codificado pelo gene SLC19A2 e o transportador de tiamina 2 (THTR-2), codificado pelo gene SLC19A3, são os responsáveis pela reabsorção de tiamina no túbulo proximal após sua filtração no glomérulo renal. Estudos já demonstraram que a excreção aumentada de tiamina pode ser um risco preditivo de

declínio precoce da função renal em pacientes diabéticos. O objetivo deste projeto é estudar a participação dos genes TXNIP, SLC19A2 e SLC19A3 na patogênese da ND em portadores de DM1. Para tanto, será extraído RNA mensageiro do sedimento urinário de portadores de DM 1 para avaliação da expressão dos genes alvos, que será associada com as manifestações da ND em quatro grupos de pacientes: (1) normoalbuminúria e TFG >60 mL/min; (2) normoalbuminúria e TFG <60 mL/min; (3) macroalbuminúria e TFG >60 mL/min e (4) macroalbuminúria e TFG <60 mL/min. O estudo da ativação ou inativação intrarenal de vias potencialmente associadas à evolução da ND em seres humanos é dificultada pela necessidade de biópsia renal. Com o desenvolvimento recente de técnicas confiáveis de extração de RNA do sedimento urinário e da técnica de RT-qPCR, a análise do mRNA do sedimento urinário pode se tornar uma ferramenta na avaliação das doenças renais, tanto na tentativa de identificar biomarcadores que possam prever a evolução da função renal como para permitir um melhor entendimento da patogênese dessa complicação.

4. Pesquisador Responsável:

Maria Lucia Cardillo Corrêa Giannella

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

Graduação: Biomedicina

Vínculo: FMUSP

5. Pesquisador Executante:

Maria Beatriz Camargo Monteiro Caillaud

<http://lattes.cnpq.br/5382962815735804>

6. Possui co-autores?

Não, Quantidade: 0

Nome dos co-autores: Não se aplica

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?

Não

9. Possui participação Estrangeira

Não

10. O projeto é multicêntrico

Não

11. Outros serviços/ divisões do HCFMUSP envolvidos na pesquisa

Não

12. Finalidade acadêmica da pesquisa e classificação

Doutorado

13. Investigação

Prospectiva

14. Materiais e métodos

Laboratorial

Prontuários de pacientes

15. Gênero, classificação da Pesquisa

Experimental

16. Áreas temáticas previstas na Res. 196/96

Armazenamento e utilização de material biológico humano

17. Patrocínio

Recursos próprios

18. Valor do financiamento

0,00

19. Cronograma de execução da pesquisa

Prazo: 48 meses

20. Assinaturas

Maria Lúcia Corrêa Giannella
CRM 62926
Endocrinologia

Assinatura e carimbo do Pesquisador

Aprovado em ____/____/____.

Aprovado "ad-referendum" o encaminhamento à Comissão
de Ética de Projetos de Pesquisa - CAPPesq. 20/06/12

Prof. Dr. Roberto Zatz

Vice Chefe do Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina USP

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

Aprovado em ____/____/____.

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: Expressão do RNA mensageiro dos genes TXNIP, SCL19A2 e SCL19A3 no sedimento urinário de portadores de diabetes mellitus tipo 1 com e sem nefropatia diabética		2. CAAE:	
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella			
6. CPF: 077.179.178-07		7. Endereço (Rua, n.º): DOUTOR ARNALDO 455 PACAEMBU 4 andar, sala 4305 SAO PAULO SAO PAULO 01246903	
8. Nacionalidade: BRASILEIRA		9. Telefone: (11) 3061-8453	10. Outro Telefone:
		11. Email: malugia@lim25.fm.usp.br	
12. Cargo:			
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p> <p>Data: <u>14</u> / <u>06</u> / <u>2012</u></p> <p style="text-align: right;"> Assinatura</p>			
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
13. Nome: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP		14. CNPJ: 60.448.040/0001-22	15. Unidade/Órgão:
16. Telefone: (11) 3069-6442		17. Outro Telefone:	
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p> <p>Responsável: <u>ELOÍSA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFÁ</u> CPF: <u>042.658.928-92</u></p> <p>Cargo/Função: <u>Diretora Clínica do HCFMUSP</u></p> <p>Data: <u>26</u> / <u>06</u> / <u>12</u></p> <p style="text-align: right;"> Assinatura</p> <p style="text-align: right;">PROFESSORA ELOÍSA BONFÁ Diretora Clínica do HCFMUSP</p>			
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.

Prof. Dr. Roberto Zatz
Vice Chefe do Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão do RNA mensageiro dos genes TXNIP, SCL19A2 e SCL19A3 no sedimento urinário de portadores de diabetes mellitus tipo 1 com e sem nefropatia diabética

Pesquisador: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 4

CAAE: 04027912.6.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 149.940

Data da Relatoria: 21/11/2012

Apresentação do Projeto:

Expressão do RNA mensageiro dos genes TXNIP, SCL19A2 e SCL19A3 no sedimento urinário de portadores de diabetes mellitus tipo 1 com e sem nefropatia diabética.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar a participação dos genes TXNIP, SCL19A2 e SCL19A3 como potenciais marcadores do comprometimento renal em portadores de DM1 e: 1) verificar se existe associação entre a expressão do mRNA desses genes no sedimento urinário de portadores de DM1 e o grau de comprometimento renal, avaliado tanto pela EUA quanto pela TFG; 2) Tratar linhagens de células epiteliais tubulares proximais com albumina glicada ou não glicada in vitro para estudar a expressão do mRNA desses genes e verificar se a via de AGEs está implicada na alteração da expressão desses genes. Portadores de diabetes mellitus tipo 1 com e sem nefropatia diabética.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá desconforto para os pacientes do estudo. O procedimento utilizado neste protocolo será exatamente como colher urina para qualquer outro tipo de exame. Não há riscos no procedimento. Quanto aos benefícios, não há benefício direto para o participante. Existe a possibilidade de que após a realização desse estudo, sejam identificados marcadores que possam ser usados para detectar doença renal. No futuro, há possibilidades de se diagnosticar e tratar com mais precisão, os portadores de diabetes que comecem a desenvolver doença renal. Nestes casos, os pacientes prescindiriam de biópsia renal, procedimento certamente mais invasivo.

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

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-6442

Fax: (11)2661-6442

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo interessante sobre a pesquisa de possíveis marcadores genéticos detectáveis na urina de portadores de diabetes melito, capazes de predizer a evolução do comprometimento renal, frequentemente presente nestes pacientes. O trabalho está bem formulado e apresenta descrição adequada da metodologia a ser aplicada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores anexam os termos de apresentação obrigatórios.

Recomendações:

Após entrevista com os pesquisadores foram esclarecidas as pendências referentes ao projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores esclareceram adequadamente aos questionamentos realizados e fizeram as alterações necessárias no TCLE.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 21 de Novembro de 2012

Assinador por:
Luiz Eugênio Garcez Leme
(Coordenador)

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

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-6442

Fax: (11)2661-6442

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão do RNA mensageiro dos genes TXNIP, SCL19A2 e SCL19A3 no sedimento urinário de portadores de diabetes mellitus tipo 1 com e sem nefropatia diabética

Pesquisador: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 04027912.6.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 982.773

Data da Relatoria: 10/02/2015

Apresentação do Projeto:

Expressão do RNA mensageiro dos genes TXNIP, SCL19A2 e SCL19A3 no sedimento urinário de portadores de diabetes mellitus tipo 1 com e sem nefropatia diabética.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar a participação dos genes TXNIP, SLC19A2 e SLC19A3 como potenciais marcadores do comprometimento renal em portadores de DM1 e: 1) verificar se existe associação entre a expressão do mRNA desses genes no sedimento urinário de portadores de DM1 e o grau de comprometimento renal, avaliado tanto pela EUA quanto pela TFG; 2) Tratar linhagens de células epiteliais tubulares proximais com albumina glicada ou não glicada in vitro para estudar a expressão do mRNA desses genes e verificar se a via de AGEs está implicada na alteração da expressão desses genes. rtadores de diabetes mellitus tipo 1 com e sem nefropatia diabética.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá desconforto para os pacientes do estudo. O procedimento utilizado neste protocolo será exatamente como colher urina para qualquer outro tipo de exame. Não há riscos no procedimento. Quanto aos benefícios, não há benefício direto para o participante. Existe a possibilidade de que após a realização desse estudo, sejam identificados marcadores que possam

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: 982.773

ser usados para detectar doença renal. No futuro, há possibilidades de se diagnosticar e tratar com mais precisão, os portadores de diabetes que comecem a desenvolver doença renal. Nestes casos, os pacientes prescindiriam de biópsia renal, procedimento certamente mais invasivo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo interessante sobre a pesquisa de possíveis marcadores genéticos detectáveis na urina de portadores de diabetes melito, capazes de predizer a evolução do comprometimento renal, frequentemente presente nestes pacientes. O trabalho está bem formulado e apresenta descrição adequada da metodologia a ser aplicada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores anexam os termos de apresentação obrigatórios.

Apresentam emenda com a seguinte justificativa:

Solicita-se neste pedido de emenda do protocolo de pesquisa no. 9409, aprovado pelo CEP sob o no.149.940, a adição de amostras de urina de pacientes portadores de Glomeruloesclerose segmental focal. Esta inclusão é necessária pois permitirá um entendimento melhor das alterações advindas apenas da nefropatia em relação àquelas advindas da nefropatia diabética. Para isso a inclusão de pacientes nefropatas não diabéticos com o mesmo grau de doença renal que os pacientes portadores de diabetes mellitus do tipo 1 poderá elucidar alguns pontos importantes de uma eventual alteração nos padrões de expressão gênica no sedimento urinário dos grupos de estudo. Caso contrário, não será possível excluir que as alterações encontradas nos pacientes diabéticos reflitam apenas as alterações na função renal não relacionadas ao diabetes. Por se tratar apenas da inclusão de um novo grupo de pacientes no estudo onde há apenas a coleta de uma amostra de urina não haverá nenhum desconforto ou risco para os voluntários.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 982.773

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 12 de Março de 2015

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

Anexo 3

Artigo científico aceito para publicação

Thioredoxin interacting protein expression in the urinary sediment associates with renal function decline in type 1 diabetes

Maria Beatriz Monteiro, Daniele Pereira Santos-Bezerra, Karina Thieme, Sharon Nina Admoni, Ricardo Vessoni Perez, Cleide Guimarães Machado, Marcia Silva Queiroz, Marcia Nery, Maria Oliveira-Souza, Viktoria Woronik, Marisa Passarelli, Daniel Giannella-Neto, Ubiratan Fabres Machado, Maria Lúcia Corrêa-Giannella

doi: 10.3109/10715762.2015.1109083

Abstract

Aims: Thioredoxin interacting protein (TXNIP), an inhibitor of antioxidant thioredoxin (Trx), is upregulated by hyperglycemia and implicated in pathogenesis of diabetes complications. We evaluated mRNA expressions of genes encoding TXNIP and Trx (*TXN*) in urinary sediment and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of type 1 diabetes (T1D) patients with different degrees of chronic complications.

Methods: qPCR was employed to quantify target genes in urinary sediment (n=55) and PBMC (n=161) from patients sorted by presence or

absence of diabetic nephropathy (DN), retinopathy, peripheral and cardiovascular neuropathy; 26 healthy controls and 13 patients presenting non-diabetic nephropathy (focal and segmental glomerulosclerosis, FSGS) were also included.

Results: Regarding the urinary sediment, *TXNIP* (but not *TXN*) expression was higher in T1D (p=0.0023) and FSGS (p=0.0027) patients *versus* controls. Expressions of *TXNIP* and *TXN* were higher, respectively, in T1D patients with *versus* without DN (p=0.032) and in those with estimated glomerular filtration rate (eGFR) <60 *versus* ≥60 mL/min/1.73m² (p=0.008). eGFR negatively correlated with *TXNIP* (p=0.04, r=-0.28) and *TXN* (p=0.04, r=-0.30) expressions. T1D patients who lost ≥5 mL/min/1.73 m² yearly of eGFR presented higher basal *TXNIP* expression than those who lost <5 mL/min/1.73 m² yearly after median follow-up of 24 months. *TXNIP* (p<0.0001) and *TXN* (p=0.002) expressions in PBMC of T1D patients were significantly higher than in controls but no differences were observed between patients with or without chronic complications.

Conclusions: *TXNIP* and *TXN* are upregulated in urinary sediment of T1D patients with diabetic kidney disease, but only *TXNIP* expression is associated with magnitude of eGFR decline.

© 2015 Taylor & Francis. This provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

DISCLAIMER: The ideas and opinions expressed in the journal's *Just Accepted* articles do not necessarily reflect those of Taylor & Francis (the Publisher), the Editors or the journal. The Publisher does not assume any responsibility for any injury and/or damage to persons or property arising from or related to any use of the material contained in these articles. The reader is advised to check the appropriate medical literature and the product information currently provided by the manufacturer of each drug to be administered to verify the dosages, the method and duration of administration, and contraindications. It is the responsibility of the treating physician or other health care professional, relying on his or her independent experience and knowledge of the patient, to determine drug dosages and the best treatment for the patient. *Just Accepted* articles have undergone full scientific review but none of the additional editorial preparation, such as copyediting, typesetting, and proofreading, as have articles published in the traditional manner. There may, therefore, be errors in *Just Accepted* articles that will be corrected in the final print and final online version of the article. Any use of the *Just Accepted* articles is subject to the express understanding that the papers have not yet gone through the full quality control process prior to publication.

Thioredoxin interacting protein expression in the urinary sediment associates with renal function decline in type 1 diabetes

Maria Beatriz Monteiro^{1*}, Daniele Pereira Santos-Bezerra^{1*}, Karina Thieme¹, Sharon Nina Admoni¹, Ricardo Vessoni Perez¹, Cleide Guimarães Machado², Marcia Silva Queiroz³, Marcia Nery³, Maria Oliveira-Souza⁴, Viktoria Woronik⁵, Marisa Passarelli⁶, Daniel Giannella-Neto⁷, Ubiratan Fabres Machado⁸, Maria Lúcia Corrêa-Giannella^{1,9§}

*Equaly contributors

¹ Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM-25), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)

² Divisão de Oftalmologia, Hospital das Clínicas, FMUSP

³ Divisão de Endocrinologia, Hospital das Clínicas, FMUSP

⁴ Laboratório de Fisiologia Renal, Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICBUSP)

⁵ Divisão de Nefrologia, Hospital das Clínicas, FMUSP

⁶ Laboratório de Lípidos (LIM-10), FMUSP

⁷ Programa de Pós-Graduação em Medicina, Universidade Nove de Julho – UNINOVE

⁸ Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia, Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICBUSP

⁹ Centro de Terapia Celular e Molecular (NUCEL/NETCEM), FMUSP

Correspondence:

Maria Lúcia Correa-Giannella, MD, PhD

Av. Dr. Arnaldo 455 # 4305 Postal code: 01246-903

Phone/Fax: + 55 11 3061 8453

E-mail: malugia@lim25.fm.usp.br

Keywords: diabetic kidney disease, urinary sediment, PBMC, diabetic complications, oxidative stress

ABSTRACT

Aims: Thioredoxin interacting protein (TXNIP), an inhibitor of antioxidant thioredoxin (Trx), is upregulated by hyperglycemia and implicated in pathogenesis of diabetes complications. We evaluated mRNA expressions of genes encoding TXNIP and Trx (*TXN*) in urinary sediment and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of type 1 diabetes (T1D) patients with different degrees of chronic complications.

Methods: qPCR was employed to quantify target genes in urinary sediment (n=55) and PBMC (n=161) from patients sorted by presence or absence of diabetic nephropathy (DN), retinopathy, peripheral and cardiovascular neuropathy; 26 healthy controls and 13 patients presenting non-diabetic nephropathy (focal and segmental glomerulosclerosis, FSGS) were also included.

Results: Regarding the urinary sediment, *TXNIP* (but not *TXN*) expression was higher in T1D (p=0.0023) and FSGS (p=0.0027) patients *versus* controls. Expressions of *TXNIP* and *TXN* were higher, respectively, in T1D patients with *versus* without DN (p=0.032) and in those with estimated glomerular filtration rate (eGFR) <60 *versus* ≥60 mL/min/1.73m² (p=0.008). eGFR negatively correlated with *TXNIP* (p=0.04, r=-0.28) and *TXN* (p=0.04, r=-0.30) expressions. T1D patients who lost ≥5 mL/min/1.73 m² yearly of eGFR presented higher basal *TXNIP* expression than those who lost <5 mL/min/1.73 m² yearly after median follow-up of 24 months. *TXNIP* (p<0.0001) and *TXN* (p=0.002) expressions in PBMC of T1D

patients were significantly higher than in controls but no differences were observed between patients with or without chronic complications.

Conclusions: *TXNIP* and *TXN* are upregulated in urinary sediment of T1D patients with diabetic kidney disease, but only *TXNIP* expression is associated with magnitude of eGFR decline.

Introduction

The thioredoxin (Trx) system is one of two major endogenous thiol-dependent antioxidant systems, together with the glutathione system. Both Trx1 and Trx2 systems, located in the cytosol and in the mitochondria, respectively, are composed by NADPH, thioredoxin reductase (TrxR) and peroxiredoxins (Prx). Another component of these systems is the thioredoxin interacting protein (TXNIP), which is able to bind to reduced Trx1 and Trx2, inhibiting their functions [1].

TXNIP is considered a physiological inhibitor of Trx, however this protein exerts several other physiological and pathological effects, not all resulting from Trx inhibition [2]. In the context of diabetes chronic complications, TXNIP is upregulated by high glucose concentrations in the retina [3], sensorial neurons [4], mesangial cells [5] and podocytes [6], where it exacerbates existing oxidative stress. Increased *TXNIP* mRNA expression has been demonstrated in rodent models of diabetic nephropathy (DN) [7, 8] as well as in biopsy renal tissue obtained from patients with diabetes [8]. Additionally, studies have implicated TXNIP in apoptosis [9] and generation of reactive oxygen species [10] in mesangial cells, epithelial to mesenchymal transition of renal tubular cells [11] and NLR family, pyrin domain containing 3 (NALP3) inflammasome activation in podocytes [6], among other effects associated with the pathogenesis of DN.

In an attempt to translate evidence mostly derived from experimental studies to the clinical setting, we evaluated mRNA expressions of *TXNIP* and *TXN* (the gene encoding Trx) in the urinary sediment of type 1 diabetes (T1D) patients with different degrees of diabetic kidney disease (DKD), and their association with urinary albumin excretion, estimated glomerular filtration rate (eGFR) and magnitude of eGFR decline. We also addressed mRNA expressions of *TXNIP* and *TXN* in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to get insights about the

status of these two components of Trx system in other cell types exposed to the diabetic milieu and to evaluate their association with diabetes microvascular complications.

Participants and Methods

Participants

This study was conducted in compliance with the Institutional Ethics Committee (Committee approvals #149,940 and # 294.169) and the Declaration of Helsinki of 1975, revised in 1983, with informed consent being given to all participants. One hundred and sixty-one T1D participants (62% women) with median (interquartile interval) of 34.0 (28.0 – 40.0) years old, median diabetes duration of 20.0 (15.0 – 27.0) years and median HbA1c of 8.2%/69 mmol/mol (7.2 – 9.4/55 - 79) were enrolled in the study and sorted according to the stages of microvascular complications. The expressions of the target genes in the urinary sediment and in PBMC were evaluated in 55 and 161 participants, respectively. All patients are followed in the Diabetes Outpatient Clinic of Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Participants with eGFR <60 mL/min/1.73 m² who did not present diabetic retinopathy were excluded from the study to minimize the possibility of including T1D patients with non-diabetic nephropathy. Healthy participants were included as the control group: n=11, 72% women, with median (interquartile interval) of 35.0 (26.0 – 55.0) years old for the urinary sediment experiments and n=26, 77% women, with 30.0 (27.0 – 34.0) years old for the PBMC experiments. Thirteen patients presenting focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS) were also included in the study as a group with non-diabetic nephropathy in the urinary sediment experiments; these patients presented a mean urinary protein excretion of 2.35 grams / 24 h and a mean eGFR of 52 mL/min/1.73 m².

Evaluation of diabetes complications

Urinary albumin-to-creatinine ratio (ACR) was used to define the stages of DN: absence of DN was defined as ACR <30 mg/g creatinine (urine evaluation n=22; PBMC evaluation n=116); incipient DN was defined as persistent microalbuminuria (ACR 30–300 mg/g creatinine; urine n=11; PBMC n=21) and overt DN was defined as macroalbuminuria (ACR >300 mg/g creatinine; urine n=22; PBMC n=24). Participants were also stratified according to CKD-EPI eGFR [12]: ≥ 60 mL/min/1.73 m² (urine n=33; PBMC n=128) or <60 mL/min/1.73 m² (urine n=22; PBMC n=33). ACR was measured in spot urine samples using nephelometry, in at least two samples collected over the preceding 6 months; 24 h proteinuria was measured by the benzethonium chloride method for participants with ACR >500 mg/g creatinine; serum creatinine concentrations were measured by the Jaffé reaction standardized to IDMS traceable creatinine, HbA1c was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) and the remaining laboratorial variables were determined by conventional laboratorial techniques.

In order to evaluate whether *TXNIP* and *TXN* expressions in the urinary sediment would influence the magnitude of eGFR decline, 45 T1D patients followed for at least 12 months since the urine collection had a new eGFR measurement. After a median follow-up of 24 months, 16 patients lost ≥ 5 mL/min/1.73m² of eGFR per year and were considered as decliners *versus* 29 non-decliners.

Retinopathy was assessed by standardized seven-field fundus photography with the use of TRC-NW8 Non-Mydriatic Retinal Camera (Topcon, Oakland, NJ, USA). The photographs were evaluated by a single ophthalmologist trained in diabetic retinopathy (DR) following the International classification of diabetic retinopathy and macular edema [13]. Patients were stratified into two groups: those without DR or with mild non-proliferative DR (n=99) and those with moderate or severe non-proliferative DR or with proliferative DR (n=50).

Diagnosis of peripheral neuropathy (PN) was made according to the sum of score of the Neuropathy Symptoms Score and Modified Neuropathy Disability Score, as proposed by Boulton and Meijer [14, 15]. Patients were stratified into two groups: those without PN (n=71) and those with PN (n= 48).

Cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) was evaluated by spectral analysis of the Heart rate variability, Ewing Tests and measurement of systolic blood pressure after three minutes standing; seven parameters were assessed: (1) spectral power in the high frequency band; (2) spectral power in the very-low-frequency band; (3) spectral power in the low frequency band; (4) expiration: inspiration ratio; (5) maximum/ minimum 30:15 ratio; (6) Valsalva ratio and (7) postural change in systolic blood pressure. Diagnosis of CAN was made as previously described [16]. The patients were stratified into two groups: those without CAN (presence of < 3 abnormal tests, n=107) and those with CAN (presence of ≥ 3 abnormal tests, n= 42).

mRNA expression in urinary sediment and PBMC

Urinary samples were collected in sterile RNase free flasks; aliquots of 10 mL were submitted to urine analysis and samples presenting $\geq 10,000$ leukocytes per cubic millimeter were discarded in order to reduce the presence of leukocyte mRNA. The urine samples were processed as previously described [17]. Only samples with a total RNA Integrity Number (RIN) > 5 following evaluation by 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) were considered suitable [18]. A total of 500 ng of total RNA was reverse-transcribed to cDNA with the use of High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions.

PBMC were collected after a 12 h-fasting period into BD Vacutainer CPT tubes (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and separated by the Ficoll method, as previously described [19]. PBMC were lysed by Trizol reagent (Life Technologies) and total RNA was isolated with the use of RNeasy Minikit (Qiagen, Germantown, MD, USA), according to manufacturer's

instructions. RNA quantity and integrity were evaluated by NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) and by 1% agarose gel electrophoresis, respectively. A total of 1,000 ng of RNA was reverse-transcribed to cDNA as described for the urinary sediment mRNA transcription.

TXNIP and *TXN* mRNA expressions in the urinary sediment and in PBMC were evaluated using the StepOne plus Real-Time PCR System (Life Technologies). For quantitative PCR, 10 µl of Taqman Gene Expression Master Mix (Life Technologies), 1 µl of hydrolysis probes set, 10 ng of cDNA, and 7 µl of RNase free H₂O were mixed. Each sample was run in duplicate. The relative mRNA abundance was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [20]. E74-Like Factor 1 (*ELF1*) was used as reference gene for the urinary sediment and β -actin (*ACTB*) for PBMC.

Cell culture

Human embryonic kidney epithelium-like cells (HEK-293) (ATCC, CRL-1573) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 5 mM glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2 mmol/L L-Glutamine (Life Technologies). Cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂, pH 7.4. The culture medium was replaced every other day. After reaching confluence, cells were exposed for 24 and 72 h to the following conditions: (1) culture medium (C); (2) 1 mg/mL of albumin (CtrlAlb); (3) 1 mg/mL of advanced glycated albumin (AGEAlb, prepared as previously described [21]); (4) 25 mM glucose (HG); (5) HG + CtrlAlb; and (6) HG + AGEAlb. After incubation, cells were lysed and mRNA isolation and evaluation of *TXNIP* expression were performed as described above; *18S* ribosomal RNA was used as the reference gene [22]. Three independent experiments were performed in triplicate.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by JMP software version 8.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Before the analyses, ACR and *TXNIP/ELF* or *ACTB* and *TXN/ELF* or *ACBT* mRNA expression levels were log10 transformed. We used the non-parametric Wilcoxon signed-rank test to identify the differences among the studied groups followed by Tukey's post-test for the analyses with three or more groups; analyses were adjusted by sex, age, diabetes duration and HbA1c. Spearman's rank correlation coefficient was used for the correlation analyses; patients with an ACR >500 mg/g creatinine were not included in the correlation analyses because we considered more appropriate to include only measurements obtained by the same methodology (ACR measured in spot urine samples using nephelometry), given that in patients with an ACR > 500 mg/g creatinine, proteinuria quantification was performed by another methodology (benzethonium chloride method) in urine samples collected over 24 h. A Receiver Operator Characteristic (ROC) curve analysis was performed to establish the best cut-off point for calculation of positive and negative likelihood ratios of *TXNIP* expression for predicting a GFR decline. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Urinary sediment

The demographic and clinical characteristics of the patients who had their urinary sediment analyzed are shown in Table 1. Patients with overt DN and with an eGFR <60 mL/min/1.73 m² presented higher plasmatic concentrations of triglycerides, in comparison to patients without DN/ with incipient DN and to patients presenting eGFR ≥ 60 mL/min/1.73 m², respectively. Patients with an eGFR <60 mL/min/1.73 m² presented a higher frequency of hypertension; the use of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) or angiotensin II receptor blockers (ARB) was more frequent among patients with incipient or overt DN in comparison to patients without DN. No significant differences were observed regarding sex, age, diabetes duration, HbA1c and total cholesterol.

TXNIP mRNA expression in T1D and FSGS patients was significantly higher than in control participants ($p=0.0023$ and $p=0.0027$, respectively) (Figure 1A), while no differences were observed in *TXN* expression among the three groups (Figure 1B). Considering only T1D patients, expression of *TXNIP* was higher in patients with DN (incipient + overt) in comparison to patients without DN ($p=0.032$) (Figure 1C). Expression of *TXN* was higher in patients with eGFR <60 mL/min/1.73m² in comparison to those with eGFR ≥ 60 mL/min/1.73m² ($p=0.008$) (Figure 1D).

Negative correlations were observed between eGFR and the expressions of *TXNIP* ($p= 0.04$, $r= -0.28$) and *TXN* ($p=0.04$, $r= -0.30$) in T1D patients (Figure 2A and 2B, respectively). No correlations were observed between the expressions of *TXNIP* or *TXN* and urinary albumin excretion (data not shown).

When 45 T1D patients followed by a median time of 24 months were sorted accordingly to the magnitude of eGFR decline, those who lost ≥ 5 mL/min/1.73 m² per year ($n=16$, decliners) presented higher *TXNIP* expression than those who lost <5 mL/min/1.73 m² per year ($n=29$,

non-decliners) (Figure 3). The positive and negative likelihood ratios of *TXNIP* expression for predicting a GFR decline ≥ 5 mL/min/1.73 m² per year were, respectively, 3.88 and 0.57.

PBMC

The demographic and clinical characteristics of the patients who had their PBMC analyzed are shown in Table 2. Group A was comprised of patients with no microvascular complications or presenting only mild non-proliferative DR (n=60) while Group B was comprised of patients presenting at least one of the following microvascular complications (DN, moderate or severe non-proliferative DR, proliferative DR, PN or CAN) (n=101). Patients in Group B presented longer diabetes duration (23 [16-30] *versus* 18 [14-25] years; median [interquartile interval]; p=0.005, respectively), higher HbA1c (8.4 [7.3-9.8] / 65.0 (56.3 – 70.5) *versus* 8.1 [7.3-8.6]% / 68.3 (56.3 – 83.6) mmol/mol; p=0.03, respectively) and higher frequency of arterial hypertension (40 *versus* 18%, respectively; p=0.01) in comparison to Group A.

TXNIP and *TXN* mRNA expressions in PBMC from T1D patients were significantly higher than in control participants (p< 0.0001 and p= 0.002, respectively) (Figures 4A and 4B); a positive correlation was observed between the mRNA expressions of these genes (p<0.0001, r= -0.40) (Figure 4C). No significant differences were observed in *TXNIP* and *TXN* expressions between patients in Groups A and B, between patients with or without DN, DR, PN, CAN or between patients with eGFR $\geq$ or <60 mL/min/1.73m².

Cell culture

The effects of glucose and albumin in *TXNIP* mRNA expression were evaluated in HEK-293 cells exposed or not to 25 mM glucose and to either CtrlAlb or AGEAlb for 24 and 72 h. No modulation was observed after 24 h (data not shown) while after 72 h the combination of 25 mM glucose with AGEAlb increased *TXNIP* mRNA expression in comparison to the control condition (p= 0.018) and to CtrlAlb (p= 0.011) or AGEAlb (p= 0.007) (Figure 5).

Discussion

The main findings of the present study were the higher expression of *TXNIP* in the urinary sediment of T1D patients with *versus* without DN, its negative correlation with eGFR and especially its higher expression in patients with a clinically relevant decline in eGFR, which suggests a relationship between *TXNIP* upregulation and renal function deterioration.

In a previous study, we have shown that urinary sediment of the patients included in this study expressed *SLC5A2*, the gene encoding SGLT2, a marker of proximal tubular cell and podocin, a marker of podocytes [23]. Therefore, the higher *TXNIP* expression in the urinary sediment of T1D patients *versus* control participants supports experimental studies which have shown that hyperglycemia upregulates *TXNIP* expression in tubular cells [24] and in podocytes [6].

The increased expression of *TXNIP* in the urinary sediment of FSGS patients compared to control participants demonstrates that *TXNIP* upregulation is not a specific finding of DKD and that factors other than hyperglycemia also increase *TXNIP* expression in renal cells. Actually, increased *TXNIP* expression was already described in hyperoxaluria [25] and in podocyte injury associated with hyperhomocysteinemia [26] and with high fructose diet [27] in preclinical studies. These three situations have in common reactive oxygen species generation and activation of the NLRP3 inflammasome mediated by *TXNIP*, the same process triggered by hyperglycemia [28]. Considering that oxidative stress is recognized in the pathogenesis of FSGS [29], it is feasible to consider the participation of *TXNIP* (and NLRP3) in this kidney disease.

Although high glucose concentrations have already been shown to be responsible for *TXNIP* upregulation in renal tubular cells [11, 30] we also investigated the effects of albumin modified by glycation in this modulation. In the present study, only cells concomitantly

treated with high glucose concentrations and albumin modified by glycation showed a significant increase in *TXNIP* expression. This probably occurred due to the large number of experimental conditions, because when we compared the control group with the group treated with 25 mM glucose, we found a significant increase in *TXNIP* expression in cells exposed to high glucose concentrations ($p = 0.01$, data not shown). It is possible that in diabetes, as observed in our experimental conditions, renal *TXNIP* expression induced by high glucose concentration is exacerbated by advanced glycation end products (AGEs). These compounds also elicit oxidative stress [31] and activation of the receptors for AGEs (RAGE) was already shown to induce *TXNIP* expression in two cell types involved in diabetes complications, retinal endothelial cells [32] and Schwann cells [33].

In contrast to *TXNIP*, *TXN* expression in urinary sediment did not significantly differ among control participants, T1D and FSGS patients. However, in T1D patients, a higher *TXN* expression was found in those with $\text{eGFR} < 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ compared to those with $\text{eGFR} \geq 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$. Although this finding may seem paradoxal, because the expression of an antioxidant molecule was found to be higher in advanced stages of DKD, it must be taken into consideration that beyond its antioxidant activity, Trx exerts multiple effects as a signaling intermediate [34]. For example, in response to oxidative stress, cytosolic Trx1 is translocated to the nucleus where it activates transcription factors, including NF- κ B [35]. There are few studies in the literature exploring the role of Trx in kidney injury. A recent study assessed Trx in the urine of patients with chronic kidney disease with or without type 2 diabetes; in the latter group, urinary Trx negatively correlated with eGFR and positively correlated with ACR [36]. In our study, we also observed a negative correlation between *TXN* expression and eGFR, even though it has not affected the magnitude of eGFR decline as observed for *TXNIP* expression. We have no clear explanation to account for the difference between *TXN* and *TXNIP* expression in predicting eGFR decline. No significant correlation

was observed between *TXN* and *TXNIP* expressions in the urinary sediment (data not shown), and while *TXNIP* expression was different between patients with and without DN (that means, urinary albumin excretion), *TXN* expression was different between patients with $\text{eGFR} \geq$ and $<60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. Thus, further studies are necessary to explore whether each one of these two components of Trx system exerts independent effects on the clinical markers of DKD.

We also addressed mRNA expressions of *TXNIP* and *TXN* in PBMC, to evaluate how the diabetic milieu affects these target genes in other cell types easily obtained in the clinical setting. We observed an increase in *TXNIP* and *TXN* expression in T1D patients compared to the control group. Recently, Guzmán et al. have shown an increased expression of *TXNIP* in PBMC from type 2 diabetes patients in comparison to controls [37]. These data suggest that increased *TXNIP* expression in PBMC from diabetes patients occurs secondary to chronic hyperglycemia, as already demonstrated for other cell types [3-6]. The magnitude of expression of *TXN* and *TXNIP* did not differ when patients were stratified by stage of DN, DR, PN and CAN, suggesting that expression of these genes in PBMC reflects the glycemic status rather than the effects of hyperglycemia in target tissues of diabetic complications. [38].

The main weaknesses of this study are the ones related to the difficulties of working with urinary sediment, such as the small number of patients for whom a good quality mRNA is obtained; urine was collected from 212 patients with T1D, 20 patients with FSGS and 70 control participants to obtain the present series. Additionally, analysis of the protein content could not be made due to the paucity of cells in the urinary sediment. On the other hand this is, as far as we know, the first study to demonstrate the variable expression of *TXNIP* and *TXN* in renal cells obtained from patients with different degrees of DKD. Moreover, the finding of a positive likelihood ratio of 3.88 for *TXNIP* expression in cells of the urinary

sediment shows that a patient is almost four-times more likely to present a GFR decline when the expression of this gene is above the cut-off value established by the ROC curve, suggesting the participation of *TXNIP* upregulation in renal function deterioration.

Conclusions

TXNIP and *TXN* are upregulated in the urinary sediment of T1D patients with DKD, but only *TXNIP* expression is associated with the magnitude of eGFR decline. Our results confirmed in the clinical setting the participation of *TXNIP* in the pathogenesis of DN, but further studies are necessary to explore the involvement of Trx in DKD.

Declaration of interest

The authors have nothing to disclose. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) to Maria Lúcia Corrêa-Giannella (12/05583-1 and 12/04831-1), Maria Beatriz Monteiro (12/02003-4), Daniele Santos-Bezerra (12/25490-8), Ubiratan Fabres Machado (12/04831-1) and Maria Oliveira-Souza (13/19569-3).

References

- [1] Lu, J.; Holmgren, A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med* **66**:75-87; 2014.
- [2] Chong, C. R.; Chan, W. P.; Nguyen, T. H.; Liu, S.; Procter, N. E.; Ngo, D. T.; Sverdllov, A. L.; Chirkov, Y. Y.; Horowitz, J. D. Thioredoxin-interacting protein: pathophysiology and emerging pharmacotherapeutics in cardiovascular disease and diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther* **28**:347-360; 2014.
- [3] Perrone, L.; Devi, T. S.; Hosoya, K. I.; Terasaki, T.; Singh, L. P. Inhibition of TXNIP expression in vivo blocks early pathologies of diabetic retinopathy. *Cell Death Dis* **1**:e65; 2010.
- [4] Price, S. A.; Gardiner, N. J.; Duran-Jimenez, B.; Zeef, L. A.; Obrosova, I. G.; Tomlinson, D. R. Thioredoxin interacting protein is increased in sensory neurons in experimental diabetes. *Brain Res* **1116**:206-214; 2006.
- [5] Kobayashi, T.; Uehara, S.; Ikeda, T.; Itadani, H.; Kotani, H. Vitamin D3 up-regulated protein-1 regulates collagen expression in mesangial cells. *Kidney Int* **64**:1632-1642; 2003.
- [6] Gao, P.; Meng, X. F.; Su, H.; He, F. F.; Chen, S.; Tang, H.; Tian, X. J.; Fan, D.; Wang, Y. M.; Liu, J. S.; Zhu, Z. H.; Zhang, C. Thioredoxin-interacting protein mediates NALP3 inflammasome activation in podocytes during diabetic nephropathy. *Biochim Biophys Acta* **1843**:2448-2460; 2014.
- [7] Hamada, Y.; Fukagawa, M. A possible role of thioredoxin interacting protein in the pathogenesis of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Kobe J Med Sci* **53**:53-61; 2007.
- [8] Advani, A.; Gilbert, R. E.; Thai, K.; Gow, R. M.; Langham, R. G.; Cox, A. J.; Connelly, K. A.; Zhang, Y.; Herzenberg, A. M.; Christensen, P. K.; Pollock, C. A.; Qi, W.; Tan, S. M.; Parving, H. H.; Kelly, D. J. Expression, localization, and function of the thioredoxin system in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **20**:730-741; 2009.
- [9] Shi, Y.; Ren, Y.; Zhao, L.; Du, C.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Li, Y.; Zhao, S.; Duan, H. Knockdown of thioredoxin interacting protein attenuates high glucose-induced apoptosis and activation of ASK1 in mouse mesangial cells. *FEBS Lett* **585**:1789-1795; 2011.
- [10] Shah, A.; Xia, L.; Goldberg, H.; Lee, K. W.; Quaggin, S. E.; Fantus, I. G. Thioredoxin-interacting protein mediates high glucose-induced reactive oxygen species generation by mitochondria and the NADPH oxidase, Nox4, in mesangial cells. *J Biol Chem* **288**:6835-6848; 2013.
- [11] Wei, J.; Shi, Y.; Hou, Y.; Ren, Y.; Du, C.; Zhang, L.; Li, Y.; Duan, H. Knockdown of thioredoxin-interacting protein ameliorates high glucose-induced epithelial to mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *Cell Signal* **25**:2788-2796; 2013.
- [12] Levey, A. S.; Stevens, L. A.; Schmid, C. H.; Zhang, Y. L.; Castro, A. F.; Feldman, H. I.; Kusek, J. W.; Eggers, P.; Van Lente, F.; Greene, T.; Coresh, J.; Collaboration, C.-E. C. K. D. E. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* **150**:604-612; 2009.
- [13] Wilkinson, C. P.; Ferris, F. L.; Klein, R. E.; Lee, P. P.; Agardh, C. D.; Davis, M.; Dills, D.; Kampik, A.; Pararajasegaram, R.; Verdager, J. T.; Group, G. D. R. P. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* **110**:1677-1682; 2003.
- [14] Boulton, A. J. M. Management of Diabetic Peripheral Neuropathy. **23**; 2005.
- [15] Meijer, J. W.; Bosma, E.; Lefrandt, J. D.; Links, T. P.; Smit, A. J.; Stewart, R. E.; Van Der Hoeven, J. H.; Hoogenberg, K. Clinical diagnosis of diabetic polyneuropathy with the diabetic neuropathy symptom and diabetic neuropathy examination scores. *Diabetes Care* **26**:697-701; 2003.
- [16] Vinik, A. I.; Ziegler, D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Circulation* **115**:387-397; 2007.
- [17] Szeto, C. C.; Chan, R. W.; Lai, K. B.; Szeto, C. Y.; Chow, K. M.; Li, P. K.; Lai, F. M. Messenger RNA expression of target genes in the urinary sediment of patients with chronic kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant* **20**:105-113; 2005.
- [18] Fleige, S.; Pfaffl, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* **27**:126-139; 2006.

- [19] Böyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **97**:77-89; 1968.
- [20] Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-408; 2001.
- [21] Okuda, L. S.; Castilho, G.; Rocco, D. D.; Nakandakare, E. R.; Catanozi, S.; Passarelli, M. Advanced glycated albumin impairs HDL anti-inflammatory activity and primes macrophages for inflammatory response that reduces reverse cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* **1821**:1485-1492; 2012.
- [22] Dumaual, C. M.; Steere, B. A.; Walls, C. D.; Wang, M.; Zhang, Z. Y.; Randall, S. K. Integrated analysis of global mRNA and protein expression data in HEK293 cells overexpressing PRL-1. *PLoS One* **8**:e72977; 2013.
- [23] Monteiro, M.; Thieme, K.; Santos-Bezerra, D.; Queiroz, M.; Passarelli, M.; Machado, U.; Giannella-Neto, D.; Oliveira-Souza, M.; Giannella, M. Association of messenger RNA expression of b 2 microglobulin in the urinary sediment of type 1 diabetes patients and chronic kidney disease. *ISN World Congress of Nephrology 2015*. Cape Town; 2015: 165-166.
- [24] Qi, W.; Chen, X.; Gilbert, R. E.; Zhang, Y.; Waltham, M.; Schache, M.; Kelly, D. J.; Pollock, C. A. High glucose-induced thioredoxin-interacting protein in renal proximal tubule cells is independent of transforming growth factor-beta1. *Am J Pathol* **171**:744-754; 2007.
- [25] Joshi, S.; Wang, W.; Peck, A. B.; Khan, S. R. Activation of the NLRP3 Inflammasome in Association with Calcium Oxalate Crystal Induced Reactive Oxygen Species in Kidneys. *J Urol* **193**:1684-1691; 2015.
- [26] Abais, J. M.; Xia, M.; Li, G.; Chen, Y.; Conley, S. M.; Gehr, T. W.; Boini, K. M.; Li, P. L. Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome activation and podocyte injury via thioredoxin-interacting protein (TXNIP) during hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem* **289**:27159-27168; 2014.
- [27] Wang, W.; Ding, X. Q.; Gu, T. T.; Song, L.; Li, J. M.; Xue, Q. C.; Kong, L. D. Pterostilbene and allopurinol reduce fructose-induced podocyte oxidative stress and inflammation via microRNA-377. *Free Radic Biol Med* **83**:214-226; 2015.
- [28] Abderrazak, A.; Syrovets, T.; Couchie, D.; El Hadri, K.; Friguet, B.; Simmet, T.; Rouis, M. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol* **4**:296-307; 2015.
- [29] Yang, S. M.; Hua, K. F.; Lin, Y. C.; Chen, A.; Chang, J. M.; Kuoping Chao, L.; Ho, C. L.; Ka, S. M. Citral is renoprotective for focal segmental glomerulosclerosis by inhibiting oxidative stress and apoptosis and activating Nrf2 pathway in mice. *PLoS One* **8**:e74871; 2013.
- [30] Huang, C.; Lin, M. Z.; Cheng, D.; Braet, F.; Pollock, C. A.; Chen, X. M. Thioredoxin-interacting protein mediates dysfunction of tubular autophagy in diabetic kidneys through inhibiting autophagic flux. *Lab Invest* **94**:309-320; 2014.
- [31] Vlassara, H.; Striker, G. E. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat Rev Endocrinol* **7**:526-539; 2011.
- [32] Perrone, L.; Devi, T. S.; Hosoya, K.; Terasaki, T.; Singh, L. P. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) induces inflammation through chromatin modification in retinal capillary endothelial cells under diabetic conditions. *J Cell Physiol* **221**:262-272; 2009.
- [33] Sbai, O.; Devi, T. S.; Melone, M. A.; Feron, F.; Khrestchatisky, M.; Singh, L. P.; Perrone, L. RAGE-TXNIP axis is required for S100B-promoted Schwann cell migration, fibronectin expression and cytokine secretion. *J Cell Sci* **123**:4332-4339; 2010.
- [34] Fujino, G.; Noguchi, T.; Takeda, K.; Ichijo, H. Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin Cancer Biol* **16**:427-435; 2006.
- [35] Hirota, K.; Murata, M.; Sachi, Y.; Nakamura, H.; Takeuchi, J.; Mori, K.; Yodoi, J. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem* **274**:27891-27897; 1999.

- [36] Tobino, K.; Muso, E.; Iwasaki, Y.; Yonemoto, S.; Kasuno, K.; Tsukamoto, T.; Nakamura, H.; Tomino, Y. Gender- and disease-specific urinary thioredoxin in chronic kidney disease patients with or without type 2 diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)* **20**:368-374; 2015.
- [37] Andrews Guzmán, M.; Arredondo Olgún, M.; Olivares Gronhert, M. Glycemic control and oxidative stress markers and their relationship with the thioredoxin interacting protein (TXNIP) gene in type 2 diabetic patients. *Nutr Hosp* **31**:1129-1133; 2014.
- [38] Răchișan, A. L.; Hrușcă, A.; Căinap, S.; Pop, T. L.; Andreica, M.; Miu, N.; Samașca, G. The activity of 8-iso-prostaglandin F2alpha as an oxidative stress marker in vivo in paediatric patients with type 1 diabetes mellitus and associated autoimmunities. *Clin Lab* **60**:253-259; 2014.

Table 1: Demographical and clinical characteristics of type 1 diabetes participants according to diabetic nephropathy (DN) stages and to estimated glomerular filtration rate (eGFR).

	Diabetic Nephropathy			<i>P</i> value	eGFR (mL/min/1.73m ²)		<i>P</i> value
	Absence (n=22)	Incipient (n=11)	Overt (n=22)		≥60 (n=33)	<60 (n=22)	
Sex (Female/Male)	13/9	8/3	12/10	n/s	17/16	16/6	n/s
Age (years)	33 (27-41)	38 (28-47)	31 (25-40)	n/s	30.5 (25.2-38)	36.5 (28.7-44.7)	n/s
Diabetes duration (years)	20 (14-29)	29 (16-33)	17.5 (14-24)	n/s	21 (15-28)	21.5 (14-30)	n/s
Arterial Hypertension (%)	36	54	68	n/s	36	77	0.0053
Use of ACEI or ARB (%)	45	90	90	0.001	63	86	n/s
HbA _{1c}				n/s			n/s
(%)	8 (6.8-8.8)	8.6 (7.9-9)	8.2 (7.2-9.1)		8.3 (7.2-8.9)	8.1 (7.2-9.1)	
(mmol/mol)	63.9 (50.8-72.6)	70.4 (62.8-74.8)	66.1 (55.1-75.9)		67.2 (55.1-73.7)	65 (55.1-75.9)	
Cholesterol				n/s			n/s
(mg/dL)	162 (148-191)	179 (150-220)	192.5 (163-222)		171 (149-201)	189.5 (156-209)	
(mmol/L)	4.1 (3.8-4.9)	4.6 (3.8-5.6)	4.9 (4.2-5.7)		4.42 (3.8-5.2)	4.9 (4-5.4)	
Triglycerides				0.02			0.0006
(mg/dL)	78 (53-88)	80 (63-91)	99.5 (70-145)		75 (55-88.5)	104 (81-128)	
(mmol/L)	0.88 (0.59-0.993)	0.90 (0.71-1.02)	1.12 (0.79-1.63)		0.84 (0.62-	1.17 (0.91-1.44)	

Data are expressed as median ± interquartile interval; eGFR: estimated glomerular filtration rate; ACEI: angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB: angiotensin II receptor blockers; n/s: non-significant.

Table 2: Demographical and clinical characteristics of type 1 diabetes participants sorted into two groups: Group A, patients with no microvascular complications or presenting only mild non-proliferative diabetic retinopathy (DR); Group B, patients presenting at least one microvascular complication (diabetic nephropathy, moderate or severe non-proliferative DR, proliferative DR, peripheral neuropathy or cardiovascular autonomic neuropathy).

	Group A (n=60)	Group B (n=101)	P value
Sex (female/male)	38 /22	62 /39	n/s
Age (years)	33 (27 – 39)	35 (30 – 43)	n/s
BMI (kg/m ²)	24.7 (23 – 28.4)	24 (21.2 – 27.3)	n/s
Diabetes duration (years)	18 (14 – 25)	23 (16 – 30)	0.005
Age at diagnosis (years)	14 (8 – 19)	11 (6 – 17)	n/s
Hb1Ac			0.03
(%)	8.1 (7.3 – 8.6)	8.4 (7.3 – 9.8)	
(mmol/mol)	65.0 (56.3 – 70.5)	68.3 (56.3 – 83.6)	
HDL-cholesterol			n/s
(mg/dL)	58.5 (45 – 74)	54.5 (43 – 70)	
(mmol/L)	1.51 (1.16 – 1.91)	1.41 (1.11 – 1.81)	
LDL-cholesterol			n/s
(mg/dL)	93 (80 – 105)	88.5 (72 – 105)	
(mmol/L)	2.40 (2.06 – 2.71)	2.27 (1.86 – 2.71)	
Total cholesterol			n/s
(mg/dL)	170 (152 – 187)	163 (146 – 186)	
(mmol/L)	4.39 (3.93 – 4.83)	4.21 (3.77 – 4.80)	
Triglycerides			n/s
(mg/dL)	74 (55 – 94)	83.5 (56 – 117)	
(mmol/L)	0.83 (0.62 – 1.06)	0.94 (0.63 – 1.32)	
Arterial hypertension (%)	18	40	0.01
Dyslipidemia (%)	16.6	28.5	n/s
Nephropathy (%)	0	44.5	-
Retinopathy (%)	40	86	-
Neuropathy (%)			
Peripheral (119 patients)			-
CAN	0	61.5	-
	0	48	

Data are expressed as median $\pm$ interquartile interval. BMI: body mass index; CAN: cardiovascular autonomic neuropathy; n/s: non-significant.

Figure captions

Fig. 1: Expression of *TXNIP* and *TXN* in the urinary sediment. Expression of *TXNIP* (Panel A) and *TXN* (Panel B), respectively, in control participants, in type 1 diabetes (T1D) patients and in focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS) patients. Expression of *TXNIP* in T1D sorted according to presence or absence of diabetic nephropathy (Panel C). Expression of *TXN* in T1D patients according to eGFR ($\geq$ or <60 mL/min/1.73 m²) (Panel D). The horizontal lines within scatterplots represent the median value and 25th to 75th percentiles (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Fig. 2: Correlations between estimated glomerular filtration rate (eGFR) and *TXNIP* (Panel A) and *TXN* (Panel B) expressions in the urinary sediment of type 1 diabetes patients

Fig. 3: Expression of *TXNIP* in the urinary sediment of type 1 diabetes patients sorted accordingly to the rate of estimated glomerular filtration rate (eGFR) decline. Non-decliners and decliners lost, respectively, <5 and ≥ 5 mL/min/1.73 m². The horizontal lines within scatterplots represent the median value and 25th to 75th percentiles (* $p<0.05$).

Fig. 4: Expression of *TXNIP* (Panel A) and *TXN* (Panel B) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from type 1 diabetes (T1D) patients and from control participants. Positive correlation between *TXNIP* and *TXN* expressions in PBMC from T1D patients (Panel C). The horizontal lines within scatterplots represent the median value and 25th to 75th percentiles (** $p < 0.01$).

Fig. 5: Expression of *TXNIP* in HEK-293 cells exposed or not to 25 mM glucose and to non-glycated or advanced glycated albumin for 72 h. C: control medium; CtrlAlb: 1 mg/mL of control albumin; AGEAlb: 1 mg/mL of advanced glycated albumin; HG: 25 mM glucose. The horizontal lines within scatterplots represent the median value and 25th to 75th percentiles (** p< 0.01).

Anexo 4

Artigo científico submetido à publicação

Endocrine

Beta-2-microglobulin (B2M) expression in the urinary sediment correlates with clinical markers of kidney disease in patients with type 1 diabetes

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	ENDO-D-15-00762									
Full Title:	Beta-2-microglobulin (B2M) expression in the urinary sediment correlates with clinical markers of kidney disease in patients with type 1 diabetes									
Article Type:	Original Article									
Corresponding Author:	Maria Lucia Correa-Giannella, MD, PhD University of Sao Paulo Sao Paulo, SP BRAZIL									
Corresponding Author Secondary Information:										
Corresponding Author's Institution:	University of Sao Paulo									
Corresponding Author's Secondary Institution:										
First Author:	Maria Beatriz Monteiro, MS									
First Author Secondary Information:										
Order of Authors:	Maria Beatriz Monteiro, MS Karina Thieme, PhD Daniele P Santos-Bezerra, MS Marcia S Queiroz, MD, PhD Marisa Passarelli, PhD Ubiratan F Machado, MD, PhD Daniel Giannella-Neto, MD, PhD Maria Oliveira-Souza, PhD Maria Lucia Correa-Giannella, MD, PhD									
Order of Authors Secondary Information:										
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR) (12/04831-1)</td><td>Ubiratan F Machado Dr Maria Lucia Correa-Giannella</td></tr> <tr> <td>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR) (12/02003-4)</td><td>Maria Beatriz Monteiro</td></tr> <tr> <td>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR) (12/05583-1)</td><td>Dr Maria Lucia Correa-Giannella</td></tr> <tr> <td>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR) (13/19569-3)</td><td>Maria Oliveira-Souza</td></tr> </table>		Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR) (12/04831-1)	Ubiratan F Machado Dr Maria Lucia Correa-Giannella	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR) (12/02003-4)	Maria Beatriz Monteiro	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR) (12/05583-1)	Dr Maria Lucia Correa-Giannella	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR) (13/19569-3)	Maria Oliveira-Souza
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR) (12/04831-1)	Ubiratan F Machado Dr Maria Lucia Correa-Giannella									
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR) (12/02003-4)	Maria Beatriz Monteiro									
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR) (12/05583-1)	Dr Maria Lucia Correa-Giannella									
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR) (13/19569-3)	Maria Oliveira-Souza									
Abstract:	<p>Purpose: After observing variation in expression of the housekeeping gene B2M in cells of urinary sediment during a study of candidate genes potentially involved in diabetic kidney disease (DKD), we hypothesized that B2M mRNA expression in the urinary sediment could reflect the extent of DKD.</p> <p>Methods: B2M mRNA expression was quantified in cells of the urinary sediment of 49 type 1 diabetes patients (63% women) sorted according to the diabetic nephropathy stages and to estimate glomerular filtration rate (eGFR). B2M mRNA expression was also evaluated in human embryonic kidney epithelium-like (HEK-293) cells exposed to 25 mM glucose and to albumin (glycated or not) in order to mimic the diabetic milieu.</p> <p>Results: B2M mRNA expression was higher in participants with diabetic nephropathy</p>									

	<p>versus participants without diabetic nephropathy and in HEK-293 cells exposed concomitantly to 25 mM glucose and albumin (glycated or not). In participants with an eGFR$\geq$60 mL/min/1.73 m², B2M expression was higher in those with overt diabetic nephropathy versus participants without diabetic nephropathy while stratification by eGFR in participants with albuminuric disease did not result in differences. B2M mRNA expression positively correlated with albuminuria in the overall population ($r=0.56$; $P=0.001$), and negatively correlated with eGFR in men ($r=-0.59$; $P=0.009$).</p> <p>Conclusions: B2M mRNA expression in urinary sediment of type 1 diabetes patients is higher in presence of overt diabetic nephropathy (macroalbuminuria), maybe reflecting a tubulointerstitial injury promoted by the combination of high glucose concentrations and albumin. Given the proinflammatory nature of B2M, we suggest that this protein contributes to diabetic tubulopathy.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Vishal Vaidya vvaidya@partners.org Dr Vaidya has been working extensively in the field of urinary biomarkers including mRNAs and microRNAs.</p>
	<p>Niels OS Camara niels@icb.usp.br Dr Camara has been working extensively with new cellular, molecular and immunological mechanisms involved in acute and chronic renal injury.</p>

Beta-2-microglobulin (*B2M*) expression in the urinary sediment correlates with clinical markers of kidney disease in patients with type 1 diabetes

Running head: *B2M* mRNA expression in the urinary sediment of type 1 diabetes people

MB Monteiro¹, K Thieme¹, DP Santos-Bezerra¹, MS Queiroz², M Passarelli³, UF Machado⁴, D Giannella-Neto⁵, M Oliveira-Souza⁶, ML Corrêa-Giannella^{1,7§}

Author's affiliations:

¹ Laboratory of Cellular and Molecular Endocrinology (LIM-25), University of São Paulo Medical School

² Endocrine Division, Hospital das Clínicas, University of São Paulo Medical School

³ Lipids Laboratory (LIM-10), University of São Paulo Medical School

⁴ Laboratory of Metabolism and Endocrinology Department of Physiology and Biophysics, Biomedical Sciences Institute

⁵ Programa de Pós-Graduação em Medicina, Universidade Nove de Julho – UNINOVE

⁶ Laboratory of Renal Physiology, Department of Physiology and Biophysics, Biomedical Sciences Institute

⁷ Laboratory of Cellular and Molecular Endocrinology (LIM-25), Cell and Molecular Therapy Center (NUCEL), University of São Paulo Medical School

Corresponding author:

Maria Lúcia Correa-Giannella, MD, PhD

Av. Dr. Arnaldo 455 # 4305 Postal code: 01246-903

Phone/Fax: + 55 11 3061 8453

E-mail: malugia@ lim25.fm.usp.br

ABSTRACT

Purpose: After observing variation in expression of the housekeeping gene *B2M* in cells of urinary sediment during a study of candidate genes potentially involved in diabetic kidney disease (DKD), we hypothesized that *B2M* mRNA expression in the urinary sediment could reflect the extent of DKD.

Methods: *B2M* mRNA expression was quantified in cells of the urinary sediment of 49 type 1 diabetes patients (63% women) sorted according to the diabetic nephropathy stages and to estimate glomerular filtration rate (eGFR). *B2M* mRNA expression was also evaluated in human embryonic kidney epithelium-like (HEK-293) cells exposed to 25 mM glucose and to albumin (glycated or not) in order to mimic the diabetic milieu.

Results: *B2M* mRNA expression was higher in participants with diabetic nephropathy *versus* participants without diabetic nephropathy and in HEK-293 cells exposed concomitantly to 25 mM glucose and albumin (glycated or not). In participants with an $\text{eGFR} \geq 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$, *B2M* expression was higher in those with overt diabetic nephropathy *versus* participants without diabetic nephropathy while stratification by eGFR in participants with albuminuric disease did not result in differences. *B2M* mRNA expression positively correlated with albuminuria in the overall population ($r=0.56$; $P=0.001$), and negatively correlated with eGFR in men ($r=-0.59$; $P=0.009$).

Conclusions: *B2M* mRNA expression in urinary sediment of type 1 diabetes patients is higher in presence of overt diabetic nephropathy (macroalbuminuria), maybe reflecting a tubulointerstitial injury promoted by the combination of high glucose concentrations and albumin. Given the proinflammatory nature of *B2M*, we suggest that this protein contributes to diabetic tubulopathy.

Key words: diabetic kidney disease, diabetic tubulopathy, glomerular filtration rate, urinary sediment, beta-2-microglobulin, type 1 diabetes mellitus

Introduction

Nodular glomerulosclerosis with accumulation of extracellular matrix proteins and mesangial expansion is considered a hallmark of diabetic nephropathy [1]. However, as for other kidney diseases [2], tubulointerstitial damage has been increasingly recognized as an important predictor of renal function decline in the diabetes setting. There are some mechanisms proposed to link glomerular and tubulointerstitial injury such as protein overload to proximal tubular cell, which triggers inflammation and fibrosis following cytokines expression [3].

As for diabetic glomerulopathy, metabolic factors have also been implicated in diabetic tubulopathy. Hyperglycemia stimulates proinflammatory (e.g. interleukin [IL]-6), angiogenic (vascular endothelial growth factor [VEGF]) and profibrotic (transforming growth factor- β [TGF- β]) responses in tubular cells. Hyperglycemia also induces the expression of toll-like receptor 4 (TLR4), which in turn attracts inflammatory cells [4]. Proteins modified by advanced glycation end products (AGE) are reabsorbed by the proximal tubules and also stimulate tubular proinflammatory molecules such as IL-8 and soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) that attracts leukocytes and macrophages as well [5].

In humans, the study of activation or inactivation of intrarenal pathways associated with diabetic kidney disease (DKD) is complicated by the need of renal biopsy. The development of reliable techniques for extraction and evaluation of messenger RNA

(mRNA) in cells of the urinary sediment provides an additional tool in the investigation of target genes potentially involved in the pathogenesis of renal diseases [6]. We started to evaluate the expression of genes candidates to be involved in DKD in cells of the urinary sediment of patients with type 1 diabetes mellitus and, during the methodology standardization, we observed a wide variation in the expression of beta-2-microglobulin (*B2M*), one of the genes tested as a potential housekeeping gene [7].

B2M encodes the β -chain of the major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and it is up-regulated in inflammatory and tumor cells [8]. As a low molecular weight protein, B2M is filtered by the renal glomeruli and almost completely reabsorbed by the proximal tubules. Although increased urinary excretion of B2M secondarily to impaired reabsorption has been proposed to be a marker of proximal tubular cell damage [9], this is true only when B2M production and glomerular filtration rate are normal and proteinuria is minimal [8].

Local infiltration of inflammatory cells is a feature of diabetic tubulopathy and that is accompanied by important changes in tubular cell phenotype [4], which might include increased local expression of the *B2M* gene. Therefore, we hypothesized that expression of *B2M* mRNA in cells of the urinary sediment could reflect the extent of renal injury. In the present study, we evaluated the mRNA expression of *B2M* in cells of the urinary sediment of type 1 diabetes patients with different degrees of DKD; we also evaluated as an underlying mechanism whether *B2M* mRNA expression is modulated by conditions mimicking the diabetic milieu in renal tubular-like cells.

Participants and Methods

Participants

This study was performed in compliance with the Institutional Ethics Committee (Committee approval #149,940 CEP/CONEP) and the Declaration of Helsinki of 1975, revised in 1983, with informed consent being given to all participants. Forty-nine type 1 diabetes participants (63% women) with median (interquartile interval) of 33.5 (27.0 - 40.5) years old, median diabetes duration of 22.0 (15.5 - 28.5) years and median HbA1c of 8.3%/67mmol/mol (7.3 - 8.8/56 - 73) were recruited in the Diabetes Outpatient Clinic of Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Participants with estimate glomerular filtration rate (eGFR) <60 ml/min/1.73 m² who did not present diabetic retinopathy were excluded from the study.

Clinical Parameters

Urinary albumin-to-creatinine ratio (ACR) was employed to define the stages of diabetic nephropathy: absence of diabetic nephropathy was defined as ACR <30 mg/g creatinine (n=19); incipient diabetic nephropathy was defined as persistent microalbuminuria (ACR 30–300 mg/g creatinine; n=10) and overt diabetic nephropathy was defined as macroalbuminuria (ACR >300 mg/g creatinine; n=20). Participants were also stratified according to CKD-EPI eGFR [10]: ≥ 60 mL (n=30) or <60 mL/min/1.73 m² (n=19). ACR was measured in spot urine samples using nephelometry, in at least two samples collected over the preceding 6 months; 24h proteinuria was measured by the benzethonium chloride method for participants with ACR >500 mg/g creatinine; serum creatinine concentrations were measured by the Jaffé reaction standardized to IDMS traceable creatinine, HbA1c was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) and the remaining laboratorial variables were determined by conventional laboratorial techniques.

Urinary mRNA expression

1 Participants' urine specimens were collected in sterile RNase free flasks. An aliquot of 10
2 mL was submitted to urine analysis and samples that presented more than 10,000
3 leukocytes per cubic millimeter of urine were discarded in order to decrease the presence
4 of leukocyte mRNA in the analysis. The urine samples were centrifuged at 3,000xg for 30
5 min at 4°C. The urinary cell pellet was lysed by Trizol reagent (Life Technologies,
6 Carlsbad, CA) and the mRNA was isolated with the use of RNeasy Minikit (Qiagen,
7 Germantown, MD). The mRNA integrity and quantity were confirmed by 2100
8 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Only samples with a mRNA
9 Integrity Number (RIN) above 5 were considered suitable [11]. A total of 500 ng of mRNA
10 was reverse-transcribed to cDNA with the use of High Capacity cDNA Reverse
11 Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA).

12 Housekeeping gene validation was performed with the use of TaqMan® Array Human
13 Endogenous Controls Plate (Life Technologies, Carlsbad, CA), containing 32 predefined
14 assays commonly used as endogenous controls, in triplicate. We tested a pool of mRNA
15 comprised of 10 type 1 diabetes urine samples. The results were analyzed by the GeNorm
16 program [12], which determined E74-Like Factor 1 (*ELF1*) as the most stable gene.

17 We evaluated urinary expression of *SLC5A2* mRNA (which encodes the SGLT2 protein, as
18 a marker of proximal tubular cells), *NPHS2* mRNA (which encodes the podocin protein, as
19 a marker of podocytes) and *B2M* mRNA (the target gene) using the StepOne plus Real-
20 Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA). Commercially available Taqman
21 primers and probes were used for all the evaluated genes (Life Technologies, Carlsbad,
22 CA). For qPCR, 10 µl of Taqman Gene Expression Master Mix (Life Technologies,
23 Carlsbad, CA), 1 µl of primer and probe set, 10 ng of cDNA, and 7 µl of RNase free H₂O
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 were mixed. Each sample was run in duplicate. The relative mRNA abundance was
2 calculated using the $2^{-\Delta C_t}$ method [13].
3
4

5 *Preparation of advanced glycated albumin and control albumin*

6
7

8
9 Advanced glycated albumin (AGEAlb) was prepared as previously described [14]. Briefly,
10 endotoxin free and fatty acid free albumin (FAFA, 40 mg/mL) was incubated with 10 mM
11 glycolaldehyde (Sigma, St. Louis, MO) for 4 days, at 37 °C, in the dark, under sterile
12 conditions and nitrogen atmosphere in a water bath shaker. Control albumin (CtrlAlb) was
13 incubated with phosphate buffered saline only. After extensive dialysis, samples were
14 sterilized.
15
16
17
18
19
20
21
22

23 *Cell culture*

24
25

26
27 Human embryonic kidney epithelium-like cells (HEK-293) (ATCC, CRL-1573) were
28 maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 5 mM glucose supplemented
29 with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2
30 mmol/L L-Glutamine (Life Technologies, Carlsbad, CA). Cells were grown at 37 °C in a
31 humidified atmosphere with 5% CO₂, pH 7.4. The culture medium was replaced every
32 other day. After reaching confluence, cells were exposed for 24 and 72 h to the following
33 conditions: (1) culture medium (C); (2) 25 mM glucose (HG); (3) HG + CtrlAlb; and (4)
34 HG + AGEAlb. After incubation, cells were lysed by mRNA lysis buffer (Qiagen Inc.) and
35 mRNA was isolated with the use of RNeasy Minikit (Qiagen, Germantown, MD). The
36 mRNA integrity and quantity were determined by the relative absorbance at 260/280 nm
37 using a UV spectroscopy (NanoDrop™ ND1000 Spectrophotometer). A total of 1,000 ng
38 of RNA was reverse-transcribed to cDNA with the use of High Capacity cDNA Reverse
39 Transcription kit (Life Technologies, Carlsbad, CA). *B2M* gene expression was evaluated
40 as described for the urinary sediment. *18S* ribosomal RNA (Life Technologies, Carlsbad,
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

CA) was used as the housekeeping gene [15]. Three independent experiments were performed (N ranging from 6 to 9).

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed by JMP software version 8.0 (SAS Institute, Cary, NC). Before the analyses, ACR and *SLC5A2*, *NPHS2*, and *B2M* mRNA expression levels were log10 transformed. We used the non-parametric Wilcoxon signed-rank test to identify the differences among the studied groups followed by Tukey's post-test for the analyses with three or more groups. For the correlation analyses, we used the Spearman's rank correlation coefficient; participants with an ACR >500 mg/g creatinine were excluded from the correlation analyses because we considered more appropriate to include only measurements obtained by the same methodology (ACR measured in spot urine samples using nephelometry), given that in participants with an ACR > 500 mg/g creatinine, proteinuria quantification was performed by another methodology (benzethonium chloride method) in urine samples collected over 24h . A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

The demographic and clinical characteristics of the participants according to diabetic nephropathy stages and to eGFR are shown in Table 1. Participants with overt DN and with an eGFR <60 mL/min/1.73 m² presented higher plasmatic concentrations of triglycerides, in comparison to absence of diabetic nephropathy/incipient diabetic nephropathy and to an eGFR ≥60 mL/min/1.73 m², respectively. Participants with an eGFR <60 mL/min/1.73 m² presented a higher frequency of arterial hypertension; the use of

angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) or angiotensin II receptor blockers (ARB) was more frequent among participants with incipient or overt diabetic nephropathy in comparison to participants without diabetic nephropathy.

The positive mRNA expression of *SLC5A2* (SGLT2) and of *NPHS2* (podocin) confirmed the presence of tubular proximal cells and podocytes, respectively, in the urinary sediment. The expression of both genes was significantly higher in participants with diabetic nephropathy (incipient or overt) in comparison to participants without diabetic nephropathy (Fig. 1). *NPHS2* mRNA expression presented a significant positive correlation with ACR ($r = 0.57$; $P = 0.005$).

The expression levels of *B2M* were higher in participants with incipient and overt diabetic nephropathy *versus* participants without diabetic nephropathy (Fig. 2A) and were also higher in participants with an eGFR <60 mL/min/1.73 m² *versus* participants with an eGFR ≥ 60 mL/min/1.73 m² (Fig. 2B). Considering only participants with an eGFR ≥ 60 mL/min/1.73 m², expression levels of *B2M* were higher in participants with overt diabetic nephropathy *versus* participants without diabetic nephropathy (Fig. 2C). No significant differences were observed in *B2M* expression levels when participants with albuminuric renal disease (presence of diabetic nephropathy) were stratified by eGFR $<$ and ≥ 60 mL/min/1.73 m². The analysis of participants with an eGFR <60 mL/min/1.73 m² stratified by diabetic nephropathy stages and also the analysis of non-albuminuric renal disease participants stratified by eGFR were not performed because there was only one participant with eGFR <60 mL/min/1.73 m² and normoalbuminuria.

B2M mRNA expression in the urinary sediment was positively correlated with ACR in the overall population with type 1 DM ($r = 0.56$; $P = 0.001$; Fig. 3A). *B2M* mRNA expression presented a marginal negative correlation with eGFR in the overall population with type 1

DM ($r = -0.28$; $P = 0.05$; Fig. 3B). After stratification by sex, a significant negative correlation was observed in men ($r = -0.59$; $P = 0.009$; Fig. 3D), but not in women ($r = -0.14$; $P = 0.42$; Fig. 3C).

In order to test the effects of glucose and of albumin in *B2M* mRNA expression, HEK-293 cells were exposed to 25 mM glucose and to 25 mM+CtrlAlb or 25 mM+AGEAlb for 24 and 72 h. No modulation was observed after 24 h (data not shown) while after 72 h the combination of 25 mM glucose with CtrlAlb and with AGEAlb increased *B2M* mRNA expression in comparison to the control condition (Fig. 4).

Discussion

B2M is well-known in nephrology, because its serum concentrations increase in parallel to the decrease in GFR, it participates in dialysis-related amyloidosis [16], and its impaired reabsorption and consequent high urinary concentrations has long been proposed as a marker of proximal tubular injury. This last assumption is true providing that the B2M rate of production, as well as GFR, are normal and proteinuria is minimal [8]. Moreover, elevated serum concentrations of B2M were already associated with increased mortality in patients with chronic kidney disease (CKD) [17], diabetes [18], and even in the general population [19], which have been attributed to its ability to trigger inflammation [20]. Despite the knowledge related to systemic B2M, little is known concerning renal *B2M* expression. We were compelled to study *B2M* as a candidate gene to be involved in DKD after observing a wide variation in its expression in cells of the urinary sediment of patients with different degrees of DKD when *B2M* was evaluated as a potential housekeeping gene.

1 It has been demonstrated that B2M stimulates monocytes to secrete proinflammatory
2 cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1, IL-6, IL-8 and IL-10 [21], and that
3
4 several cytokines can increase the expression of B2M in macrophages [22], possibly
5
6 establishing a vicious circle. Given the role of inflammation in diabetic tubulopathy, it is
7
8 plausible to speculate that our findings of increased *B2M* mRNA expression in cells of the
9
10 urinary sediment of participants with DKD reflect the extent of tubulointerstitial injury in
11
12 these participants. The findings that in participants with an eGFR ≥ 60 mL/min/1.73 m²,
13
14 expression levels of *B2M* were higher in those with overt diabetic nephropathy *versus*
15
16 participants without diabetic nephropathy while stratification by eGFR in participants with
17
18 albuminuric disease did not result in significant differences suggest that increased *B2M*
19
20 expression reflects more the exposure of tubular cells to albuminuria than glomerular
21
22 function. However we cannot exclude glomerular cells as a source of increased *B2M*
23
24 expression since podocin mRNA was detected in the urinary sediment.
25
26
27
28
29
30
31

32
33 Endorsing the possibility of expression by tubular cells, we observed that a high glucose
34
35 concentration combined with albumin modified or not by advanced glycation was capable
36
37 of increasing *B2M* mRNA expression in HEK-293 cells. These data is in agreement with
38
39 the up-regulation of *B2M* mRNA observed in the retina of two mouse models of diabetes
40
41 [23], and denote that the diabetic milieu is implicated in *B2M* up-regulation in target cells
42
43 of diabetes complications.
44
45
46
47
48

49 The only previous study that measured *B2M* mRNA expression in urinary sediment for the
50
51 evaluation of renal disease included patients with pre-existing CKD stages 2, 3 or 4
52
53 (etiology not mentioned) presenting acute renal function deterioration, with the aim of
54
55 searching for noninvasive prognostic biomarkers [24]. Although *B2M* mRNA expression
56
57 did not correlate with the degree of renal function recovery in the follow-up period, it
58
59
60
61
62
63
64
65

presented a significant inverse correlation with baseline eGFR in the overall population (comprised of two-thirds of men) [24], a result that resembles the one found in the present study for men. These results suggest some sexual dimorphism in the pattern of *B2M* mRNA expression in the kidney of diabetes patients, which may be in line with the idea that sex-biased gene-expression differences in somatic tissues may underlie some males and females phenotypic differences, such as the faster progression of kidney diseases in men than in women [25].

The main limitations of this study are the ones related to the intrinsic difficulties of working with cells of the urinary sediment, such as the limited number of participants for whom a good quality mRNA is obtained. Moreover, the paucity of material hampers analysis of the protein content and the precise definition of the cell types which gave rise to the evaluated mRNA, although the expression of SGLT2 and podocin ensures that proximal tubular cells and podocytes are present in the sediment. On the other hand, the concordance of some of our findings with those of two previous studies makes it likely that the methodology had been successfully employed: the inverse correlation between *B2M* mRNA expression and eGFR [24] and the positive correlation between *NPHS2* (podocin) mRNA expression and ACR [26].

Conclusions

We have observed that *B2M* mRNA expression in cells of the urinary sediment of type 1 diabetes patients is higher in presence of macroalbuminuria (overt diabetic nephropathy), maybe reflecting a tubulointerstitial injury promoted by the combination of high glucose

1 concentrations and albumin. Given the proinflammatory nature of B2M, we suggest that
2 this protein contributes to diabetic tubulopathy.
3
4
5
6
7
8

9 **Funding:** This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do
10 Estado de São Paulo (FAPESP) to Maria Lúcia Corrêa-Giannella (12/05583-1 and
11 12/04831-1), Maria Beatriz Monteiro (12/02003-4), Ubiratan Fabres Machado (12/04831-
12 1) and Maria Oliveira-Souza (13/19569-3).
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 **Conflict of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

1. Tervaert, T.W., Mooyaart, A.L., Amann, K., Cohen, A.H., Cook, H.T., Drachenberg, C.B., Ferrario, F., Fogo, A.B., Haas, M., de Heer, E., Joh, K., Noël, L.H., Radhakrishnan, J., Seshan, S.V., Bajema, I.M., Bruijn, J.A., Society, R.P.: Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **21**(4), 556-563 (2010). doi:10.1681/ASN.2010010010
2. Nath, K.A.: Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis* **20**(1), 1-17 (1992).
3. Gilbert, R.E., Cooper, M.E.: The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? *Kidney Int* **56**(5), 1627-1637 (1999). doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00721.x
4. Tang, S.C., Leung, J.C., Lai, K.N.: Diabetic tubulopathy: an emerging entity. *Contrib Nephrol* **170**, 124-134 (2011). doi:000325647 [pii]10.1159/000325647
5. Tang, S.C., Leung, J.C., Chan, L.Y., Tsang, A.W., Lai, K.N.: Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy and the role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist. *J Am Soc Nephrol* **17**(6), 1633-1643 (2006). doi:ASN.2005101113 [pii]10.1681/ASN.2005101113
6. Wang, G., Szeto, C.C.: Quantification of gene expression in urinary sediment for the study of renal diseases. *Nephrology (Carlton)* **12**(5), 494-499 (2007). doi:10.1111/j.1440-1797.2007.00836.x
7. Lee, S., Jo, M., Lee, J., Koh, S.S., Kim, S.: Identification of novel universal housekeeping genes by statistical analysis of microarray data. *J Biochem Mol Biol* **40**(2), 226-231 (2007).
8. Miyata, T., Jadoul, M., Kurokawa, K., Van Ypersele de Strihou, C.: Beta-2 microglobulin in renal disease. *J Am Soc Nephrol* **9**(9), 1723-1735 (1998).
9. Tomlinson, P.A.: Low molecular weight proteins in children with renal disease. *Pediatr Nephrol* **6**(6), 565-571 (1992).
10. Levey, A.S., Stevens, L.A., Schmid, C.H., Zhang, Y.L., Castro, A.F., Feldman, H.I., Kusek, J.W., Eggers, P., Van Lente, F., Greene, T., Coresh, J., Collaboration), C.-E.C.K.D.E.: A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* **150**(9), 604-612 (2009).
11. Fleige, S., Pfaffl, M.W.: RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* **27**(2-3), 126-139 (2006). doi:10.1016/j.mam.2005.12.003
12. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F.: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**(7), RESEARCH0034 (2002).
13. Livak, K.J., Schmittgen, T.D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4), 402-408 (2001). doi:10.1006/meth.2001.1262
14. Okuda, L.S., Castilho, G., Rocco, D.D., Nakandakare, E.R., Catanozi, S., Passarelli, M.: Advanced glycated albumin impairs HDL anti-inflammatory activity and primes macrophages for inflammatory response that reduces reverse cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* **1821**(12), 1485-1492 (2012). doi:10.1016/j.bbailip.2012.08.011
15. Dumaual, C.M., Steere, B.A., Walls, C.D., Wang, M., Zhang, Z.Y., Randall, S.K.: Integrated analysis of global mRNA and protein expression data in HEK293 cells overexpressing PRL-1. *PLoS One* **8**(9), e72977 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0072977
16. Drüeke, T.B., Massy, Z.A.: Beta2-microglobulin. *Semin Dial* **22**(4), 378-380 (2009). doi:10.1111/j.1525-139X.2009.00584.x
17. Liabeuf, S., Lenglet, A., Desjardins, L., Neiryneck, N., Glorieux, G., Lemke, H.D., Vanholder, R., Diouf, M., Choukroun, G., Massy, Z.A., (EUTox), E.U.T.W.G.: Plasma beta-2 microglobulin is associated with cardiovascular disease in uremic patients. *Kidney Int* **82**(12), 1297-1303 (2012). doi:10.1038/ki.2012.301

18. Cheung, C.L., Lam, K.S., Cheung, B.M.: Serum β -2 microglobulin predicts mortality in people with diabetes. *Eur J Endocrinol* **169**(1), 1-7 (2013). doi:10.1530/EJE-13-0003
19. Astor, B.C., Shafi, T., Hoogeveen, R.C., Matsushita, K., Ballantyne, C.M., Inker, L.A., Coresh, J.: Novel markers of kidney function as predictors of ESRD, cardiovascular disease, and mortality in the general population. *Am J Kidney Dis* **59**(5), 653-662 (2012). doi:10.1053/j.ajkd.2011.11.042
20. Chen, N.X., O'Neill, K.D., Niwa, T., Moe, S.M.: Signal transduction of beta2m-induced expression of VCAM-1 and COX-2 in synovial fibroblasts. *Kidney Int* **61**(2), 414-424 (2002). doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00136.x
21. Xie, J., Yi, Q.: Beta2-microglobulin as a potential initiator of inflammatory responses. *Trends Immunol* **24**(5), 228-229; author reply 229-230 (2003).
22. Nachbaur, K., Troppmair, J., Bieling, P., Kotlan, B., König, P., Huber, C.: Cytokines in the control of beta-2 microglobulin release. I. In vitro studies on various haemopoietic cells. *Immunobiology* **177**(1), 55-65 (1988).
23. Freeman, W.M., Bixler, G.V., Brucklacher, R.M., Walsh, E., Kimball, S.R., Jefferson, L.S., Bronson, S.K.: Transcriptomic comparison of the retina in two mouse models of diabetes. *J Ocul Biol Dis Infor* **2**(4), 202-213 (2009). doi:10.1007/s12177-009-9045-3
24. Luk, C.C., Chow, K.M., Kwok, J.S., Kwan, B.C., Chan, M.H., Lai, K.B., Lai, F.M., Wang, G., Li, P.K., Szeto, C.C.: Urinary biomarkers for the prediction of reversibility in acute-on-chronic renal failure. *Dis Markers* **34**(3), 179-185 (2013). doi:10.3233/DMA-120959
25. Rinn, J.L., Snyder, M.: Sexual dimorphism in mammalian gene expression. *Trends Genet* **21**(5), 298-305 (2005). doi:10.1016/j.tig.2005.03.005
26. Zheng, M., Lv, L.L., Ni, J., Ni, H.F., Li, Q., Ma, K.L., Liu, B.C.: Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. *PLoS One* **6**(5), e20431 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0020431

Figure legends

Fig. 1: Expression of SGLT2 (*SLC5A2*) and podocin (*NPHS2*) in participants with absence or presence of diabetic nephropathy. mRNA expression of *SLC5A2* (SGLT2, panel a) and *NPHS2* (podocin, panel b) normalized by *ELF1* gene expression in type 1 diabetes participants with presence (incipient or overt diabetic nephropathy [DN]) and absence of DN. The horizontal line within the box plot represents the median value, and the bars refer to 25th to 75th interquartile range for mRNA levels.

Fig. 2: Expression of *B2M* according to diabetic nephropathy status or estimated glomerular filtration rate. mRNA expression of *B2M* normalized by *ELF1* gene expression in type 1 diabetes participants according to the diabetic nephropathy (DN) stages (panel a), to estimated glomerular filtration rate (eGFR) (panel b), and to DN stages in participants with an eGFR ≥ 60 ml/min/1.73 m² (panel c). The horizontal line within the box plot represents the median value, and the bars refer to 25th to 75th interquartile range for mRNA levels.

Fig. 3: Correlations between *B2M* mRNA expression and urinary albumin-to-creatinine ratio or estimated glomerular filtration rate. Correlations between *B2M* mRNA expression and urinary albumin-to-creatinine ratio in the overall type 1 DM population (panel a) or estimated glomerular filtration rate (eGFR) in the overall type 1 DM population (panel b), in women (panel c) and in men (panel d) with diabetes (r =Spearman's rank correlation coefficient).

Fig. 4: Expression of *B2M* in HEK-293 cells exposed or not to 25 mM glucose and to 1mg/mL of non-glycated (CtrlAlb) or advanced glycated (AGEAlb) albumin. mRNA expression of *B2M* normalized by *18S* gene expression in HEK-293 cells exposed for 72 h to control medium (C); 25 mM glucose (HG); HG + CtrlAlb and HG + AGEAlb. The

horizontal line within the box plot represents the median value, and the bars include the 25th to 75th interquartile range for mRNA levels.

.

Figure1
[Click here to download Figure: Figure 1.jpg](#)

Figure2
[Click here to download Figure: Figure 2.jpg](#)

Figure3
[Click here to download Figure: Figure 3.jpg](#)

Figure4

[Click here to download Figure: Figure 4.jpg](#)

Tables

Table 1: Demographical and clinical characteristics of the participants according to diabetic nephropathy (DN) stages and to estimated glomerular filtration rate (eGFR).

	Diabetic Nephropathy			<i>P</i> value	eGFR (mL/min/1.73m2)		<i>P</i> value
	Absence (n=19)	Incipient (n=10)	Overt (n=20)		≥60 (n=30)	<60 (n=19)	
Sex (Women/Men)	12/7	8/2	11/9	0.53	17/13	14/5	0.26
Age (years)	32.5 (26.5-38)	38.5 (28-47)	31.5 (25.2-41)	0.68	30.5 (25.7-38)	36.5 (28.2-43)	0.11
Diabetes duration (years)	21.0 (17-32)	29.0 (28-47)	17.5 (14-24.7)	0.10	23 (16.7-29)	23 (14-30)	0.99
Arterial Hypertension (%)	25	21	53	0.06	42	57	0.003
Use of ACEI or ARB (%)	42.1	90	75	0.01	60	73.6	0.55
HbA1C (mmol/mol)	66 (52-73)	67 (61-75)	65 (55-72)	0.58	67 (57-74)	61 (55-72)	0.88
(%)	8.2 (6.9-8.8)	8.3 (7.7-9)	8.1 (7.2-8.7)		8.3 (7.4-8.9)	8.1 (7.2-8.7)	
Cholesterol (mg/dL)	168 (149-194)	185 (153-220)	193 (162-227)	0.08	172 (153-202)	192 (155-211)	0.27
Triglycerides (mg/dL)	76 (49-87)0	80 (60-94)	96 (69-148)	0.03	75 (55-89)	104 (79-137)	0.003

Data are expressed as median ± interquartile interval. eGFR: estimated glomerular filtration rate; ACEI: angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB: angiotensin II receptor blockers.