ARITANIA SOUSA SANTOS

**Expressão de microRNAs circulantes relacionados ao
diabetes tipo 1 autoimune**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra Maria Elizabeth Rossi da
Silva

São Paulo
2018

ARITANIA SOUSA SANTOS

**Expressão de microRNAs circulantes relacionados ao
diabetes tipo 1 autoimune**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra Maria Elizabeth Rossi da
Silva

São Paulo
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Aritania Sousa

Expressão de microRNAs circulantes relacionados
ao diabetes tipo 1 autoimune / Aritania Sousa
Santos. -- São Paulo, 2018.

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

Programa de Endocrinologia.

Orientador: Maria Elizabeth Rossi da Silva.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 1
2.Autoimunidade 3.Biomarcadores 4. MicroRNAs 5.
Complexo principal de histocompatibilidade
6.Autoanticorpos

USP/FM/DBD-029/18

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

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaios - LIM-18 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP - Projeto número 2014/15971-4

Ao Deus

*Incomparável e Magnífico, mestre por
excelência e*

Digno de toda honra, eu dedico este projeto

AGRADECIMENTOS

A Deus pela concretização deste projeto, agradeço por ter me conduzido até a reta final!

À minha orientadora Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva, por ter me confiado a execução deste projeto, muitas vezes um pouco árduo e por toda dedicação lado a lado. Obrigada por tudo!

À minha querida mãe Júlia pela força e incentivo a cada dia para a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos: Val, Nalva, Selma, Manoel, Sueli, .. meu muito obrigada pelas palavras positivas em todo o tempo.

À Eunice e Rita, pela força, em momentos difíceis... obrigada pelas palavras confortadoras... me fazendo perseverar....

À Cátia... em especial, por todas as vezes que precisei, corrigindo “paper” e também sempre com uma palavra amiga e desafiadora.

Ao Edson, que sempre acompanhou tudo de perto, obrigada pelo carinho.

Aos demais familiares.... Obrigada pela torcida.

À Dani, que sempre acompanhou de perto toda esta trajetória e que a cada etapa, se alegrava comigo...valeu Dani!

À Adriana Secafim e Cristiane, obrigada por toda animação e palavras carinhosas.

À Dra Dalva Marreiro Rocha muito querida e amável, agradeço pela força que recebi durante todo este tempo.

À Dra. Maria Edna Melo, pela amizade e palavras animadoras ... sempre!!

Ao Dr. Bruno Ferraz, sempre prestativo quando precisava!

Ao Dr. Nelson Gonfinetti, pela imensa ajuda em nos trazer os pacientes recém diagnosticados com diabetes tipo 1 autoimune.

À Dra. Rosa Ferreira dos Santos, por todo incentivo e acompanhamento nesta trajetória.

À Dra. Maysa Vieira, obrigada pelas palavras incentivadoras.

À Dra. Teresa Colvara Mattana pelo carinho e amizade.

Ao Dr. Vinicius Costa pela amizade e palavras encorajadoras.

Ao Dr. Sérgio Pimentel, por ter sempre uma palavra de incentivo, em relação ao projeto.

À Dra. Maria Fernanda de Lucca, minha médica querida, por sua alegria contagiante, sempre perguntando sobre o andamento do projeto.

À Dra. Michele, agradeço por todo incentivo.

À Dra. Maria Lúcia Giannella, sempre prestativa e solícita.

À Profa. Dra. Ludmila Rodrigues por todo ensinamento neste vasto mundo dos microRNAs

Ao Prof Dr Edécio, pelas ricas colocações e observações no projeto e por todo incentivo

À Dra. Juliana Monte Real pelas orientações referentes às análises dos microRNAs

Ao Jullian Damasceno pelo empenho e dedicação na avaliação bioinformática dos microRNAs

Aos colegas que finalizaram o doutorado e outros que estão em curso e que passaram por mim nesta trajetória, companheiros de bancada e ensinamentos: Dr. Diego, Dr. Rodrigo, Dra Adriana, Dra. Ligia, Dra. Karol, Dra. Maria Beatriz, MSc. Daniele, MSc. Paula Ramos e MSc. Guilherme

Às colegas ... Dra. Valéria, Dra. Patrícia, Dra. Marisa Passareli, Dra. Edna Nakandacare, Dr. Eder Quintão... sempre com palavras animadoras.

Aos colegas que compartilhei bancadas e ensinamento no Incor: Amanda, Darlan, Ricardo, Almir, Vagner, João.

À minha amiga Jéssica, mesmo longe..., mas sempre com palavras desafiadoras!

Às minhas amigas Dra. Priscila e Dra. Dayane, valeu pela força e palavras preciosas.

À Maria José por toda ajuda e sempre solidária no que for possível.

Ao Rodolfo Batista, por toda ajuda na separação das amostras.

À Greci, pelo incentivo e também pelas mãos de fada nas coletas.

À Maria de Fatima pelas palavras de animo desde o início neste projeto.

À Maria do Carmo pelas palavras sábias e incentivo em todo o tempo.

À minha amiga Dra. Flávia Siqueira, te agradeço pela imensa ajuda...e disponibilidade na reta final desta tese. Incansavelmente!

À Rosinha Fukui, excelente profissional por toda ajuda e palavras animadoras, sempre!

À minha amiga Suze, sempre com palavras desafiadoras e de ânimo!

Ao Laboratório de Carboidratos e Radioimunensaaios – LIM18.

Ao Laboratório de Imunologia do Incor, aonde realizei a prática deste projeto!

Ao Grupo dos Escoteiros Mirins do Estado de São Paulo, pelas coletas de sangue para o grupo controles saudáveis.

Ao Ambulatório do Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A todos os pacientes crianças e adolescentes, arrolados neste projeto, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão financeira no desenvolvimento deste Projeto.

"O Autor da existência, Deus, do qual ouvimos muito falar e conhecemos tão pouco. Ele observou sua capacidade de lutar e por fim, o premiou com o maior de todos os Prêmios: o MILAGRE DA VIDA."

Augusto Cury

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

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*.

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

SUMÁRIO

Lista de siglas

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Diabetes mellitus tipo 1 autoimune (DM1A)	02
1.2 Epidemiologia do Diabetes Mellitus Tipo 1 Autoimune	04
1.3 Genética do Diabetes Mellitus Tipo 1 Autoimune	06
1.4 Imunidade celular e humoral	06
1.5 miRNA e diabetes mellitus tipo 1 autoimune	09
1.5.1 Biologia dos miRNAs	11
1.5.2 Biogênese dos miRNAs	13
1.5.3 miRNAs e Resposta Imune	19
1.6 Justificativa do estudo	22
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 MÉTODOS	29
3.1 Casuística	30
3.2 Coleta de Sangue Periférico e Preparação do Soro	31
3.3 Controle de Qualidade das Amostras de Soro- Avaliação da Hemólise por Espectrofotometria	32
3.4 Medidas de controle – processamento das amostras	32
3.5 Extração do RNA Total no Soro, incluindo os miRNAs	33
3.6 Determinação da Concentração do RNA Total	34
3.7 Reação de Transcrição Reversa (RT)	35

3.8 Reação de Pré-Amplificação	36
3.9 Descrição da Placa TLDA (TaqMan® Low Densitiy Array-Card A)	36
3.10 Quantificação Relativa da Expressão dos miRNAs - (RT-qPCR)	37
3.11 Análise da Expressão do Perfil dos microRNAs	38
3.12 Ensaios Individuais -TaqMan®microRNA Assays	39
3.13 Quantificação Relativa dos níveis dos miRNAs no Soro	40
3.14 Análises Bioquímicas	41
3.14.1 Glicemia	41
3.14.2 Hemoglobina Glicada	42
3.14.3 Peptídeo-C	43
3.14.4 Autoanticorpos Pancreáticos	43
3.14.5 Genotipagem do sistema HLA DR-DQ (genérico e subtipagem)	45
3.15 Análise da expressão diferencial do perfil dos miRNAs por Bioinformática	46
3.16 Predição dos alvos e vias dos miRNAs	47
3.17 Análise Estatística	48
4 RESULTADOS	49
4.1 Expressão dos microRNAs – Projeto piloto	53
4.2 Ensaios individuais de validação – Ensaios TaqMan® RT-qPCR do miR-101-3p e miR-204-5p	55
4.3 Correlações da expressão de hsa-miR-101-3p com parâmetros fisiopatológicos do DM1A	62
4.4 Alvos potenciais e vias reguladas pelo miR-101-3p no DM1A	62
4.5 Perfil de expressão dos microRNAs	64
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÕES	86
7 ANEXOS	88
Anexo A – miRNA Placa TLDA - em negrito os miR's do estudo	89
Anexo B – Características demográficas e clínicas dos indivíduos portadores de diabetes tipo 1 autoimune (DM1A) diagnóstico recente	92

Anexo C – Características demográficas e clínicas dos indivíduos portadores de anticorpos pancreáticos positivos sem diabetes (AcP)	93
Anexo D – Características demográficas e clínicas dos indivíduos portadores de diabetes tipo 1 A com duração 2-5anos (DM1A 2-5)	94
Anexo E – Características demográficas e clínicas dos indivíduos controles saudáveis (C)	95
Anexo F – microRNAs em que não houve amplificação nos 4 grupos estudados	96
8 REFERÊNCIAS	98

APÊNDICES

Apêndice 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Apêndice 2 – Aprovação Plataforma Brasil

Apêndice 3 – Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética

LISTA DE SIGLAS

HC-FMUSP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo

LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR	região 3' não traduzida do RNA
AKT	proteína-cinaseB
Anti-GAD-65	Antienzima descarboxilase do ácido glutâmico 65
Anti-IA2	Anticorpo anti- tirosina fosfatase
Anti-ZnT8	Anticorpo anti transportador 8 do Zinco
Bcl2	<i>B-Cell CLL/Lymphoma 2</i>
CV	Coeficiente de variação
cDNA	DNA complementar
c-Met	receptor do fator de crescimento do hepatócito
c-Rel	<i>proto-oncogene c-Rel</i>
DM1A	Diabetes mellitus tipo 1 autoimune
DMG	Diabetes mellitus gestacional
Ephrin	<i>erythropoietin-producing human hepatocellular receptors</i>
EZH2	<i>histona metiltransferase</i>
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HGF	fator de crescimento de hepatócitos
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HLA-DR-DQ	Alelos do HLA
IAA	Autoanticorpo antiinsulina
ICA	Anticorpo anti ilhotas de Langerhans citoplasmático
IFN- γ	Interferon gama
IGF1	<i>insulin-like growth fator</i>
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IRS-2	<i>insulin receptor substrate 2</i>
Jak-STAT	<i>janus kinase/signal transducers and activators of transcription</i>
LMO7	<i>LIM domain only 7</i>

MAP-kinase-ERK1/2	<i>Mitogen-activated protein kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 1</i>
microRNA	Pequenas moléculas de RNA não codificadores
min	minutos
miR ou miRNA	microRNA
miRBase	Banco de dados de microRNAs
MKP-1	<i>MAP quinase fosfatase 1</i>
mRNA	RNA mensageiro
<i>Naives</i>	virgens
NF- κ B <i>nuclear factor kappa B</i>	fator nuclearkappa B
Ngn3	<i>neurogenin3</i>
NK	Células <i>Natural Killer</i>
<i>NK</i>	<i>natural killer</i>
NOD	<i>non-obese diabetes</i>
NOS2	sintaxe de óxido nítrico induzida
<i>Oneut2</i>	<i>one cut homeobox 2</i>
PBMC	células linfomononucleares
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
<i>Pdx-1</i>	Fator promotor de insulina 1
PGC-1 α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor co-activator-1</i> α
PI3K-Akt	<i>phosphatidylinositol-3-kinases- Protein kinase B</i>
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
pre-miRNA	microRNA precursor
pri-miRNA	microRNA primário
Ptch1	<i>Protein patched homolog 1</i>
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RISC	complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto

RT	Transcrição reversa
SOCS3	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
STZ	estreptozotocina
T CD 8 +	Linfócitos T CD8+
T CD4+	Linfócitos T Auxiliares CD4+
TLDA	TaqMan low density array
TLR	<i>receptor Toll-like</i>
TNF α	fator de necrose tumoral alfa
Tob1	<i>Transducer of ERBB2, 1</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Txnip	<i>(Thioredoxin-interacting protein)</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

β	beta
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
μL	microlitro
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	mililitro
nU/mL	nanounidades por mililitro
ng/mL	nanograma por mililitro
$\text{ng}/\mu\text{L}$	nanograma por microlitro
UI/mL	Unidades internacionais por mililitro
dL	decilitro
mg	miligrama
s	segundo
$\%$	percentual
$\pm$	mais ou menos
$\geq$	maior igual
$\leq$	menor igual
$<$	menor
$>$	maior

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biossíntese dos miRNA	14
Figura 2	Placa TLDA	38
Figura 3	Representação de Volcano plot demonstrando os miRNAs diferencialmente expressos nos grupos controles (indivíduos saudáveis) e indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 1 autoimune com diagnóstico recente (DM1A). Os dados são apresentados em fold change (eixo x) e significância estatística (-log10, valor de p, eixo y). Os pontos acima da linha azul indicam valor de $p < 0,05$ e os abaixo da linha $p > 0,05$	54
Figura 4	Expressão relativa nos níveis séricos do miR-101-3p nos indivíduos controles saudáveis, portadores de autoanticorpos (AcP) e pacientes com diabetes tipo 1 autoimune (DM1A). * $p < 0,05$	57
Figura 5	Expressão relativa dos níveis séricos do miR-204-5p nos indivíduos controle saudáveis, portadores de autoanticorpos (AcP) e pacientes com diabetes tipo 1 autoimune (DM1A). Não houve diferença estatística entre os grupos	58
Figura 6	Expressão relativa nos níveis séricos do miR-101-3p nos indivíduos controles saudáveis, portadores de 2 ou + autoanticorpos pancreáticos (AcP) e pacientes com diabetes tipo 1 autoimune (DM1A). * $p < 0,05$	59
Figura 7	Indivíduos portadores de anticorpos pancreáticos positivos que evoluíram para o diabetes tipo 1 autoimune (DM1A). Tempo 0 indica o diagnóstico do DM1A. A. Níveis de concentração de glicose; B. Expressão relativa de miR-101-3p; C. Título de	

	autoanticorpo anti-transportador de zinco-T8; D. Título de autoanticorpo anti-tirosina fosfatase; E. Título de autoanticorpo anti-descarboxilase de ácido glutâmico 65; F. Título de autoanticorpo anti- insulina	61
Figura 8	Vias canônicas potenciais enriquecidas no diabetes tipo1 autoimune	63
Figura 9	Vias adicionais que podem ser patogeneticamente relevantes no diabetes tipo1 autoimune	64
Figura 10	Expressão relativa dos miRNAs: miR-16, miR-195, miR-200a, miR-454 nos grupos AcP (portador de autoanticorpos), DM1A (diabetes autoimune de início recente) e DM1A 2-5 (diabetes autoimune com 2-5 anos de duração)	66
Figura 11	Expressão relativa dos miRNAs: miR-15b, miR-92a, miR-100, miR-181a; miR-193a-5p;miR-323-3p,miR-423-5p e miR-483-5p, nos grupos AcP (portador de autoanticorpos), DM1A (diabetes autoimune de inicio recente) e DM1A 2-5 (diabetes autoimune com 2-5 anos de duração)	66
Figura 12	Expressão relativa dos miRNAs: miR-19a, miR-25, miR-191, miR-376a; miR-485-3p e miR-590-5p nos grupos AcP (portador de autoanticorpos), DM1A (diabetes autoimune de inicio recente) e DM1A 2-5 (diabetes autoimune com 2-5 anos de duração)	67
Figura 13	Via canônicas enriquecidas associadas a 5 microRNAs microRNAs:miR-193a5p; miR-423-5p; miR-485-3p;miR-483-5p e miR-590-5p	68
Figura 14	Tecidos Vias canônicas enriquecidas associadas a 5 microRNAs::miR-193a5p; miR-423-5p; miR-485-3p;miR-483-5p e miR-590-5p	69

Figura 15	Sítios de expressão para 5 microRNAs - analisados pelo COSMIC microRNAs:miR-193a5p; miR-423-5p; miR-485-3p;miR-483-5p e miR-590-5p	70
------------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	miRNAs associados com a diferenciação das células β , secreção de Insulina e resposta imunológica estudados no Diabetes	23
Tabela 2	Características demográficas e clínicas de indivíduos saudáveis (grupo controle), indivíduos portadores de anticorpos pancreáticos positivos sem diabetes (grupo AcP), indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 1 autoimune com diagnóstico recente (grupo DM1A), indivíduos portadores de diabetes tipo 1 autoimune, com duração de 2-5 anos (grupo DM1A 2-5)	52
Tabela 3	Características clínicas dos pacientes portadores do diabetes mellitus tipo 1 autoimune (DM1A) e indivíduos normais ou controle do estudo piloto	56
Tabela 4	Expressão relativa dos níveis circulantes do miR-101-3p e miR-204-5p dos indivíduos com diabetes tipo 1 autoimune (DM1A) e portadores de autoanticorpos (AcP) em comparação com indivíduos controles saudáveis	57
Tabela 5	Características demográficas e clínicas dos indivíduos com diabetes tipo 1, indivíduos portadores de dois ou mais autoanticorpos e indivíduos controles saudáveis ..	59
Tabela - Anexo A	microRNA placa TDLA – em negrito os miR's do estudo	89
Tabela - Anexo B	Características demográficas e clínicas dos indivíduos portadores de diabetes tipo 1 autoimune (DM1A) diagnóstico recente	92
Tabela - Anexo C	Características demográficas e clínicas dos indivíduos portadores de anticorpos pancreáticos positivos sem diabetes (AcP)	93

Tabela -	Características demográficas e clínicas dos indivíduos	
Anexo D	portadores de diabetes tipo 1 A com duração 2-5anos	
	(DM1A 2-5)	94
Tabela -	Características demográficas e clínicas dos indivíduos	
Anexo E	controles saudáveis (C)	95
Tabela -	microRNAs que não houve amplificação nos 4 grupos	
Anexo F	estudados.....	96

RESUMO

Santos AS. *Expressão de microRNAs circulantes relacionados ao diabetes tipo 1 autoimune* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: O diabetes tipo 1 autoimune (DM1A) está associado a alterações na imunidade inata e adaptativa. A agressão autoimune, órgão específica, determina a destruição das células β do pâncreas e a deficiência da produção de insulina. O infiltrado inflamatório do tipo linfomononuclear, configurando a insulite, e a escassez ou a ausência das células β , definem o quadro histológico do DM1A. Os autoanticorpos contra antígenos das células β , que geralmente se desenvolvem na fase pré-clínica, conferem predisposição para DM1A. No entanto, é difícil definir quando e quais indivíduos progredirão para o diabetes manifesto, justificando a busca de outros biomarcadores que auxiliem nas indicações de tratamentos preventivos. Nesse contexto, sabe-se que os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs que atuam pós transcrição, desempenham papel crucial na regulação de genes, integrando fatores genéticos e ambientais e influenciando o funcionamento de órgãos e tecidos de maneira pontual ou sistêmica. **OBJETIVOS:** avaliar o envolvimento biológico e a relevância da expressão de miRNAs na resposta imunológica e na função das células β na patogênese do DM1A. **MÉTODOS:** analisamos o perfil dos miRNAs séricos em 4 grupos, a saber: pacientes portadores de DM1A, até 6 meses do diagnóstico (DM1A recente), (n=30); pacientes portadores de DM1A com duração de 2-5 anos (DM1A 2-5)(n=26) e indivíduos com autoanticorpos pancreáticos positivos sem diabetes (AcP) (n=25), os quais foram comparados aos indivíduos controles saudáveis(n= 29). A expressão dos microRNAs foi obtida com ensaios individuais TaqMan® MicroRNA Assays 5x primers e *TaqMan MicroRNA Human Array Card A*, (Applied Biosystems-Forster City CA, USA) constituído por 377 alvos e 4 endógenos. Os dados de expressão foram analisados no *Software Cloud*, (Thermo Fisher Scientific) e no programa *Limma (Linear Models for Microarray and RNA-Seq Data)*. **RESULTADOS:** Não houve diferença nas características demográficas, como idade, cor auto referida e sexo entre os grupos ($p>0,05$). Pacientes portadores de DM1A (recente e com duração de 2-5 anos), diferiram do grupo controle pelos valores elevados de glicose, hemoglobina glicada, títulos de autoanticorpos pancreáticos, e menores de peptídeo C ($p<0,05$) e foram semelhantes entre si. Os portadores de autoanticorpos (AcP) tinham características intermediárias entre os grupos: menores valores de HbA1c e de anticorpo anti-tirosina-fosfatase (anti-IA2) e maiores de peptídeo C em

relação aos dois grupos com diabetes. Diferiram dos controles apenas pelos maiores títulos de anticorpo anti-insulina (IAA) e anti-descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD65). A frequência dos alelos HLA de risco para diabetes (–DR3 ou –DR4 e –DQ2 ou DQ-8) decresceu dos grupos DM1A recente e DM 2-5 para AcP e controles. Foram avaliados 135 miRNAs que estavam expressos em 20% ou mais das amostras dos quatro grupos analisados. Maior expressão foi observada em 13, 4 e 33 miRNAs dos grupos AcP, DM1A recente e DM1A 2-5 respectivamente e menor em 11, 7 e 31 miRNAs destes grupos. Destes, 4 miRNAs foram diferencialmente expressos nos grupos AcP, DM1A recente e DM1A 2-5 em relação ao grupo controle. Os miRNAs: miR -16, miR-195 e miR-454, relacionados com regeneração endócrina do pâncreas, efeito anti-inflamatório e resposta à injúria da célula β estavam diminuídos nestes 3 grupos. O miR-200a, implicado em apoptose das células β , estava aumentado nos grupos AcP e DM1A recente e diminuído nos pacientes com maior duração do diabetes (DM1A 2-5), possivelmente devido à escassez destas células. Outros 8 miRNAs apresentaram expressão diferente da do grupo controle em dois dos grupos avaliados, e tendência semelhante no terceiro grupo, sendo 4 deles elevados (miR-193a-5p, miR-323-3p, miR-423-5p, e miR-92a) e 4, diminuídos (miR-191, miR-19a, miR-376a, miR-590-5p) ou neutralidade no 3º grupo (miR-15b, miR-100, miR-181a e miR-483-5p) Resposta antagônica foi observada para o miR-25 e miR-485-3p, diminuídos no grupo AcP e aumentados no DM1A 2-5. Tais miRNAs estão relacionados com resposta imunológica, secreção de insulina, lesão de células β e glicotoxicidade, à semelhança do observado para o miR-101-3p, validado por ensaios individuais numa casuística maior. **CONCLUSÃO:** nossos dados sugerem que miRNAs circulantes podem estar envolvidos na patogênese do DM1A.

Descritores: diabetes mellitus tipo 1; autoimunidade; biomarcadores; microRNAs; complexo principal de histocompatibilidade; autoanticorpos

SUMMARY

Santos AS. *Expression of circulating microRNAs related to autoimmune type 1 diabetes (T1D)* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

INTRODUCTION: Autoimmune type 1 diabetes (T1D) is associated with changes in innate and adaptive immunity. The organ-specific autoimmune aggression determines the destruction of β -cells in the pancreas and the deficient insulin production. The inflammatory infiltration of the lymphomononuclear type, configuring the insulite, and the scarcity or the absence of the β cells, define the histological picture of T1D. Autoantibodies against β -cell antigens, which usually develop in the preclinical phase, confer predisposition to T1D. However, it is difficult to define when and which individuals will progress to overt diabetes, justifying the search for other biomarkers that could be indicative of preventive treatments. In this context, it is known that the microRNAs (miRNAs) - small RNAs that act post transcription - play a crucial role in regulating genes and in integrating genetic and environmental factors, influencing the function of organs and tissues in a punctual or systemic way. **OBJECTIVES:** to evaluate the biological involvement and relevance of miRNA expression in the immune response and β -cell function in the pathogenesis of T1D. **METHODS:** we analyzed the profile of serum miRNAs of 4 groups, namely: patients with T1D up to 6 months after diagnosis (recent T1D), (n = 30); patients with T1D lasting 2-5 years (T1D 2-5) (n = 26) and individuals expressing pancreatic autoantibodies without diabetes (AbP) (n = 25), which were compared to healthy controls (n = 29). Expression of the microRNAs was obtained with individual assays TaqMan® MicroRNA Assays 5x primers and TaqMan MicroRNA Human Array Card A (Applied Biosystems-Forster City CA, USA), consisting of 377 targets and 4 endogenous. The expression data was analyzed in the Cloud Software (Thermo Fisher Scientific) and Limma (Linear Models for Microarray and RNA-Seq Data) program. **RESULTS:** There was no difference in demographic characteristics, such as age, self-reported color, and sex among groups (p > 0.05). Patients with T1D (both recent and 2-5 years), similar to each other, differed from the control group by high glucose, glycated hemoglobin levels, pancreatic autoantibody titers, and lower C peptide values (p < 0.05). Pancreatic autoantibodies (AbP) carriers had intermediate characteristics among the groups: lower HbA1c and anti-tyrosine phosphatase antibody (anti-IA2) values and higher C-peptide levels than the two groups with diabetes. They differed from controls only by the higher titers of anti-insulin (IAA) and anti-decarboxylase of glutamic acid 65 (anti-GAD65) autoantibodies. The frequency of high risk HLA alleles for diabetes (-DR3 or -DR4 and -DQ2 or DQ-8) decreased from the recent T1D and T1D 2-5 groups to the AbP and controls. We evaluated 135 miRNAs that were expressed in 20% or more of the samples from the four groups analyzed. Higher expression was observed in 13, 4 and 33 miRNAs of the Abp, recent T1D and T1D 2-5 groups respectively and lower in 11, 7 and 31 miRNAs of these groups. Of these, 4 miRNAs were differentially

expressed in the AbP, recent T1D and T1D 2-5 groups in relation to the control group. The miRNAs: miR -16, miR-195 and miR-454, related to endocrine regeneration of the pancreas, anti-inflammatory effect and response to β -cell injury were decreased in these 3 groups. miR-200a, implicated in β -cell apoptosis, was increased in the recent and decreased AbP and T1D groups in patients with longer duration of diabetes (T1D 2-5y), possibly due to the shortage of these cells. Another eight miRNAs showed different expression of the control group in two of the evaluated groups, and a similar trend in the third group, four of them high (miR-193a-5p, miR-323-3p, miR-423-5p, and miR-92a) and four, decreased (miR-191, miR-19a, miR-376a, miR-590-5p) or neutrality in the 3rd group (miR-15b, miR-100, miR-181a and miR-483-5p) was observed for miR-25 and miR-485-3p, decreased in the AbP group and increased in T1D 2-5y. Such miRNAs are related to immune response, insulin secretion, β -cell damage and glycototoxicity, similar to that observed for the miR-101-3p, validated by individual trials in a larger cohort. **CONCLUSION** Our data suggests that circulating miRNAs may be involved in the pathogenesis of T1D.

Descriptors: diabetes mellitus, type 1; autoimmunity; biomarkers; microRNAs; major histocompatibility complex; autoantibodies

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus tipo 1 autoimune (DM1A)

O Diabetes é uma doença heterogênea resultante de inúmeros mecanismos que conduzem à hiperglicemia crônica^{1,2}. A prevalência mundial de diabetes aumentou drasticamente nos últimos 50 anos e é esperado que afete 592 milhões de pessoas em 2035, tornando o diabetes um dos principais problemas de saúde pública³. O diabetes pode ser classificado em categorias, incluindo tipo 1, tipo 2, diabetes mellitus gestacional (DMG) e outros tipos específicos, associados a distúrbios que afetam o fígado, o pâncreas, o tecido adiposo e as glândulas endócrinas. Fatores genéticos e ambientais atuam na fisiopatologia do diabetes, mas os mecanismos moleculares e celulares subjacentes não são totalmente compreendidos.

O Diabetes tipo 1 autoimune (DM1A) é caracterizado pela heterogeneidade genética e baixa penetrância na transmissão familiar. A susceptibilidade genética é influenciada principalmente por alelos relacionados ao complexo principal de histocompatibilidade (HLA) que codificam as moléculas HLA-classe II, além de inúmeros outros genes que condicionam a resposta imunológica⁴.

A agressão autoimune, órgão específica, determina a destruição das células β do pâncreas e a deficiência na produção de insulina⁵. O grau de destruição celular é variável. É rápido e intenso em crianças e adolescentes, resultando na necessidade precoce e permanente do hormônio e risco de

cetoacidose, ou é de instalação mais lenta, em adultos, que podem reter a função residual das células- β por até alguns anos após o diagnóstico.

O DM1A é caracterizado pela presença de autoanticorpos contra antígenos pancreáticos, níveis elevados de glicose e distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, que acarretam alterações estruturais em diversos órgãos e sistemas, incluindo a microangiopatia (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e a macroangiopatia (doença coronariana, insuficiência arterial periférica e do sistema nervoso central) ^{5,6,7}. É uma das doenças crônicas mais comuns em crianças e adultos jovens, e acomete cerca de 0,3% da população caucasiana⁷.

A sua instalação clínica costuma ser abrupta, mas a sua evolução não é aguda, como se admitia previamente, e sim, um processo de autoagressão lento, que se desenvolve numa fase pré-clínica, de duração de vários anos. Durante o curso da doença, falhas nos mecanismos de tolerância central e periférica permitem a ativação / expansão de células T auto-reativas⁸, assim como outros tipos de células imunológicas, incluindo os linfócitos B, como evidenciado pelo desenvolvimento de autoanticorpos contra autoantígenos da ilhota, na maioria dos pacientes⁹.

Por ocasião do diagnóstico, na presença de hiperglicemia e cetose, as células secretoras de insulina já estão em número reduzido ou ausentes ^{6,7,10}.

O infiltrado inflamatório do tipo linfomononuclear, configurando a insulite, e a escassez ou a ausência de células β , definem o quadro histológico do DM1A. As células secretoras de outros hormônios, como o glucagon,

somatostatina e polipeptídeo pancreático, também presentes nas ilhotas pancreáticas, são poupadas^{6,7,10}.

O DM1A é frequentemente associado à doença autoimune tireoidiana, doença celíaca, doença de Addison e várias outras doenças autoimunes, relacionadas aos mesmos determinantes genéticos e caracterizadas por autoanticorpos órgãos-específicos^{6,7}.

1.2 Epidemiologia do Diabetes Mellitus Tipo 1 Autoimune

O DM1A compreende 90% dos casos de diabetes da infância e 5 a 10% daqueles de início na idade adulta, sendo que 40% do DM1A ocorre até os 20 anos de idade¹⁰. A idade de diagnóstico é mais frequente entre 8 e 13 anos de Idade^{6,7}.

Predomina na raça branca, porém sua incidência é variável entre populações e áreas geográficas, refletindo diferenças entre *background* genético e fatores ambientais desencadeantes^{11,12}.

No Brasil, a incidência é de 8/100.000/ano^{11,12}. A incidência anual de DM1A está aumentando em 3,2% nos mais jovens, principalmente naquele manifestado antes dos 5 anos de idade, sugerindo fator ambiental atuante^{13,14}. Em 532 pacientes com DM1A analisados na cidade de São Paulo, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), a idade de diagnóstico foi $11,6 \pm 7,5$ anos e houve predomínio da raça branca: 81,3% brancos e 18,6% não brancos¹⁵.

A agregação familiar é baixa (6%), mas superior à da população normal e a concordância entre gêmeos monozigóticos (50%) difere acentuadamente da dos dizigóticos (5%), evidenciando a interação entre patrimônio genético e ambiente¹².

Os determinantes ambientais mais implicados no DM1A são as infecções virais (*coxsackie B*, citomegalovírus, rubéola, caxumba, sarampo), os alimentos (introdução precoce do leite de vaca, cereais e glúten), as toxinas (derivados de compostos N-nitroso) e a deficiência de vitamina-D^{12,14}.

Os vírus têm sido considerados o gatilho ambiental para o diabetes tipo 1A em indivíduos geneticamente susceptíveis^{16,17}. Estudos epidemiológicos reforçam a ideia de que a incidência de viroses no diabetes do tipo 1 pode variar de acordo com a época e mês do nascimento^{18,19}. O vírus *coxsackie B* tem sido associado à auto-imunidade de células beta²⁰ e os estudos in vitro de ilhotas em humanos têm relatado que este vírus infecta preferencialmente células beta humanas em detrimento das células alfa, consistente com o desaparecimento seletivo das células beta, visto no diabetes tipo 1²¹.

A microbiota intestinal, regida por inúmeras variáveis, incluindo a genética do hospedeiro, as influências dietéticas e o uso de antibióticos, emerge como importante influência ambiental²²⁻²⁴.

Vários estudos observaram diferenças na microbiota de pacientes diabéticos tipo 1 comparados com controles saudáveis²⁵⁻²⁸, bem como alterações na microbiota durante a progressão do diabetes, especificamente entre o momento da soroconversão e o início clínico da doença²⁹. A autoimunidade contra as células β tem sido associada à redução da

diversidade microbiana e do filo *Firmicutes* bacteriano relativo ao Bacteroidetes²⁸.

Outros fatores não genéticos modificadores da doença incluem administração de vacinas, estresse emocional, influências climáticas, sazonalidade, agentes sanitários e acesso aos cuidados de saúde¹².

1.3 Genética do Diabetes Mellitus Tipo 1 Autoimune

O diabetes tipo 1 é uma doença complexa, acompanhada de alterações na imunidade inata e adaptativa. Embora poligênica, a maior contribuição genética é conferida pelos *locus* do HLA, especificamente os haplótipos DRB1*03-DQB1*0201(DR3) e DRB1*04-DQB1*0302 (DR4). São observados em cerca de 90% dos portadores de diabetes tipo 1A³⁰ e também de outras doenças auto-imunes³¹, advindos principalmente da população europeia. A hipótese é que estes alelos de alto risco tenham sido selecionados evolutivamente pela sua capacidade de apresentar ampla gama de peptídeos microbianos para as células T³², tornando a defesa imunológica mais robusta. Em contraste, os alelos HLA, DQB1*0503, *0601, *0602 e *0603 são protetores e raramente são observados em pacientes com diabetes tipo 1A³³. Há também mais de 60 *loci* não-HLA que conferem risco menor³⁴.

1.4 Imunidade celular e humoral

O processo de destruição das células β pancreáticas decorre da agressão imunológica mediada por células linfocitárias, macrófagos e células

NK (*natural killer*), sendo assim, um processo dependente da imunidade celular^{6,12}.

No camundongo NOD (*non-obese diabetes*), modelo animal de diabetes autoimune, a destruição das células produtoras de insulina mimetiza aquela observada em humanos³⁵.

Análises imunohistoquímicas de tecido pancreático revelam que os primeiros tipos celulares a infiltrarem as ilhotas de *Langerhans* são as células dendríticas e os macrófagos, promovendo a insulite. A apresentação de autoantígenos específicos das células β pancreáticas pelos macrófagos e /ou células dendríticas para os linfócitos T CD4⁺ é o primeiro evento no processo de autoimunidade no DM1A³⁵.

Ativados, os macrófagos secretam citocinas que induzem a migração celular e estimulam vários tipos celulares a secretar radicais livres, extremamente tóxicos às células β pancreáticas³⁵.

Durante o processo de insulite, que parece ocorrer com maior intensidade em ilhotas onde existem células β metabolicamente ativas, os linfócitos T CD8⁺ são as células predominantes. Tais linfócitos, após o reconhecimento dos autoantígenos pancreáticos, efetuam a destruição das células β por citólise, através da liberação de perforinas e granzimas, e também por indução de apoptose. Dessa maneira, macrófagos, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ atuam sinergicamente na destruição das células β pancreáticas^{12,36}.

O antígeno específico da célula β , alvo inicial do sistema imune, não está definido, mas os autoanticorpos contra vários componentes das células

β (imunidade humoral), presentes no soro de pacientes recém diagnosticados e de indivíduos que posteriormente desenvolveram a doença, são importantes marcadores da progressão da mesma^{6,12,36}.

A produção de anticorpos pelos linfócitos B não parece ser apenas secundária à destruição das células β e ao estímulo pelos linfócitos T. As células B também agem como apresentadoras de antígeno, processo necessário à expansão eficiente de células T CD4⁺ auto-reativas diabetogênicas. Assim, no DM1A, além da perda da tolerância pelas células T, há também perda da tolerância pelas células B, que expressam imunoglobulinas auto-reativas¹²⁻¹³.

Os marcadores humorais mais frequentes da agressão imune são os autoanticorpos anti-insulina (IAA), anti-ilhotas de Langerhans citoplasmático (ICA), antienzima descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD65) e antiproteína de membrana com homologia às tirosino - fosfatases ou antiantígeno 2 do insulinoma (anti-IA2). Os autoanticorpos são raros na população controle não diabética – frequência de 2 a 5% na nossa população^{12,37}.

Os autoanticorpos contra células β geralmente se desenvolvem em um *cluster*, geralmente na fase pré-clínica, e a presença de vários autoanticorpos das ilhotas confere elevado risco de diabetes futuro, estimado em cerca de 85% em um período de 15 anos^{38,39}. Apesar de estudos detalhados de vários alvos dos anticorpos, torna-se de difícil prever o momento da manifestação clínica, destacando a necessidade de biomarcadores adicionais.

Sabe-se que as melhores medidas de atividade das doenças são obtidas no tecido alvo. No entanto, as ilhotas pancreáticas humanas são inacessíveis *in vivo* e são demasiado difusas para imagem. Em contraste, o sangue periférico é altamente acessível para amostragem sequencial, tornando-o um substituto possível. Além disso, entre o sangue, sistema linfático e sítios de doença ativa, há uma troca dinâmica de células, proteínas (citocinas / quimiocinas) e outros fatores (inflamatórios, lipídeos, microRNA e outras moléculas). Como tal, a amostragem de sangue pode oferecer meios minimamente invasivos para entender e seguir a progressão do diabetes no homem⁴⁰.

1.5 miRNA e diabetes mellitus tipo 1 autoimune

Durante os últimos anos, esforços consideráveis têm sido dedicados à elucidação dos mecanismos moleculares subjacentes à falência das células β e ao desenvolvimento da resistência à insulina. Perfil global de RNA mensageiro tem proporcionado informações valiosas a respeito de possíveis mudanças na expressão dos genes que ocorrem nas células β e nos tecidos alvo da insulina, no contexto de diabetes⁴¹.

Os mecanismos moleculares e celulares subjacentes à patogénia do diabetes não são totalmente compreendidos. Há aproximadamente 20 anos, alterações epigenéticas, determinadas por pequenos RNAs de 21-25 nucleotídeos não codificadores de fita simples, denominados microRNAs (miRNAs ou miRs), surgem como um novo mecanismo de regulação pós-

transcricional dos genes e tem auxiliado na compreensão de diversos processos biológicos e doenças⁴²⁻⁴⁴.

Seu conhecimento permitirá, no futuro, a introdução de mecanismos capazes de bloquear ou retardar o processo de destruição autoimune⁴²⁻⁴⁴. Assim, os miRNAs estão envolvidos em processos fisiológicos, incluindo a proliferação celular, diferenciação, apoptose e metabolismo^{42,45,46}. Consequentemente, a sua desregulação parece estar envolvida em várias doenças, incluindo doenças metabólicas e autoimunes, como o diabetes^{45,47}.

Os miRNAs têm sido detectados em vários fluídos biológicos, incluindo o sangue, urina, saliva, leite materno, lágrimas, fluidos seminais, amniótico e cefalorraquidiano⁴⁸.

A estabilidade dos miRNAs circulante pode ser explicada, pelo menos em parte, pela sua associação com proteínas, tais como 2-Argonauta⁴⁹, o HDL⁵⁰ e nucleofosmina-1⁵¹ ou o seu acondicionamento em vesículas (por exemplo corpos apoptóticos, microvesículas, exossomas)^{52,53}. Devido à sua estabilidade, os miRNAs circulantes poderiam ser utilizados como biomarcadores, e esta possibilidade é atualmente explorada numa vasta gama de doenças, incluindo o diabetes^{45,54,55}.

Com efeito, eles podem ser facilmente obtidos utilizando procedimentos não invasivos. Além disso, seus níveis podem ser medidos por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR), que permite uma fácil, rápida, sensível detecção e quantificação específica⁵⁶.

Neste contexto, surge o questionamento, se os miRNAs circulantes poderiam ser tais biomarcadores. A observação da desregulação dos perfis

de miRNAs em diferentes fluidos biológicos de pacientes diabéticos comparados com controles saudáveis foi a primeira evidência apoiando a ideia de que miRNAs poderiam ser biomarcadores do diabetes. O padrão de miRNA de pacientes com diabetes tipo 1, também difere dos indivíduos saudáveis no soro⁵⁷, bem como no plasma^{58, 59} e na urina⁵⁸. Além disso, o conteúdo de miRNA em diferentes tipos de células do sangue, também está alterado⁶⁰⁻⁶⁴.

A maioria dos estudos analisou amostras de sangue e urina, pois são facilmente recolhidos por métodos não invasivos e proporcionam suficiente volume para análise.

Um grupo de investigadores relatou concentrações mais elevadas de miRNA no soro circulante do que no plasma, sugerindo que alguns miRNAs sejam perdidos durante a preparação do plasma, o que torna o uso do soro mais apropriado⁶⁵.

1.5.1 Biologia dos miRNAs

Os miRNAs foram descobertos em *Caenorhabditis elegans* em 1993⁶⁶ e, mais tarde, em vertebrados e plantas. Atualmente, milhares de miRNAs foram identificados, fazendo deles uma das classes mais abundantes de moléculas de genes regulatórios em organismos multicelulares. O banco de dados de miRNAs conhecido como miRBase traz um registro de 2588 miRNAs maduros em humanos. (Release 21, Junho 2014; <http://www.mirbase.org/>).

Estes RNAs não-codificadores comportam-se como silenciadores de genes específicos por emparelhamento com as regiões 3'UTRs do mRNA alvo⁴², interferindo na estabilidade ou na eficiência da tradução do transcrito⁴²⁻⁴⁴, acarretando alteração da síntese proteica do gene alvo, sem impactar nos níveis correspondentes de mRNA⁶⁷.

A interação miRNA-mRNA não precisa ser necessariamente perfeita, ou seja, que todos os nucleotídeos do miRNA estejam ligados ao mRNA. Normalmente, em mamíferos, essa ligação é imperfeita. Dessa forma, a não obrigatoriedade de interação completa somada ao fato dos miRNAs possuírem seqüências pequenas, permite que um único miRNA regule centenas de genes alvo distintos⁶⁸. Além disso, dados recentes sugerem que os miRNAs podem também estimular a tradução do mRNA⁶⁹ ou se ligar à região promotora dos genes, ativando a transcrição⁷⁰. Há também evidências que os miRNAs podem regular os níveis de outros miRNAs⁷¹ e a abundância de miRNAs específicos pode ser dependente de vários estímulos, como nutrientes, citocinas e hormônios⁷²⁻⁷⁴. Desta forma, os miRNAs regulam vários processos biológicos como proliferação, diferenciação celular, apoptose e metabolismo⁷⁵. Expressão aberrante de miRNAs contribui para inúmeras doenças humanas, incluindo o câncer⁷⁶, as doenças degenerativas⁷⁷, o diabetes⁷⁸, as doenças cardíacas⁷⁹, renais⁸⁰ e hepáticas⁸¹, além de interferirem na função do sistema imune⁸², entre outras.

1.5.2 Biogênese dos miRNAs

Os miRNAs são sintetizados geralmente a partir de genes específicos de miRNA ou de determinadas regiões gênicas não associadas à produção de proteínas (íntrons)^{42-44,67}.

A biogênese dos miRNAs inclui sua transcrição no núcleo celular, exportação para o citoplasma e subsequente processamento e maturação⁸³. Na maioria dos casos, a transcrição dos genes miRNAs é mediada pela RNA polimerase II⁸⁴, uma enzima que também é responsável pela transcrição de genes que codificam proteínas⁸⁵.

Os nucleotídeos dos transcritos primários dos miRNAs (pri-miRNA) formam estruturas secundárias, como as regiões “*stem*”, em que dois segmentos de RNA com bases complementares são pareados, e as regiões *loop*, nas quais os pares de bases não são complementares, constituindo, assim, alças circulares. No núcleo, os pri-miRNA são processados por um complexo que inclui a enzima *Drosha* e uma proteína de ligação de RNA de dupla fita. A estrutura resultante, designada miRNA precursor (pré-miRNA), é exportada para o citoplasma por meio da exportina-5⁸⁵.

No citoplasma, os pré-miRNAs são processados pela enzima *Dicer*, que remove a alça na estrutura *stem-loop*, resultando na formação de um duplex de RNA. Este duplex de RNA é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), no qual as duas fitas de RNA são separadas. Uma destas fitas permanece associada ao RISC e constitui o miRNA maduro, ao passo que a fita complementar sofre degradação⁸⁵ (**FIGURA 1**).

Figura 1. Biossíntese dos miRNA. O miRNA primário (pri-miRNA) é transcrito ou produzido no núcleo. Ele é processado ou modificado pela enzima Drosha e exportado para o citoplasma pela Exportina-5. No citoplasma, agora chamado pré-miRNA, é novamente processado por outra enzima, a Dicer, formando enfim o miRNA maduro. O miRNA maduro se associa a um complexo ou conjunto de enzimas chamado RISC que reprime ou inibe a síntese de proteínas pela clivagem (quebra) de RNAs mensageiros (mRNA) ou impede a tradução do mRNA, inibindo a produção de proteínas. *J F Rev (2012) (Adaptada).*

A implicação dos miRNAs na regulação da secreção de insulina veio com a clonagem do miR-375, um dos miRNAs abundante nas ilhotas pancreáticas e nas células β , que interfere negativamente com a secreção de insulina estimulada pela glicose ⁸⁶.

Estudos recentes têm confirmado o papel importante e direto dos miRNAs na secreção da insulina⁸⁶, no desenvolvimento das ilhotas pancreáticas⁸⁷, na diferenciação das células β ⁸⁸ e, indiretamente, no

metabolismo da glicose e lipídico⁸⁹, estando também envolvidos em complicações secundárias associadas com o diabetes⁹⁰.

Também no diabetes autoimune sua influência tem sido investigada. Sabe-se que a pesquisa de genes associados com susceptibilidade ao diabetes mellitus tipo 1A identificou inúmeros genes candidatos⁹¹. No entanto, polimorfismos que alterem as suas sequências codificadoras não são usualmente encontrados no diabetes tipo 1A, sugerindo a possibilidade que variantes em sequências regulatórias não codificadoras possam induzir modificações fenotípicas, seja alterando elementos regulatórios, como as sequências promotoras⁹² ou a região 3' UTR, a exemplo dos microRNAs^{93,94}. Zhou et al. verificaram relação entre a posição genômica de 27 miRNAs com 9 *loci* específicos para o diabetes tipo 1, indicando que os miRNAs podem também ser candidatos ou biomarcadores para o diabetes autoimune em humanos⁹³.

De fato, vários miRNAs, como o miR-375, miR-9, miR-34a, miR-124a^{86,88,94-97}, estão envolvidos no diabetes tipo 1, regulando genes importantes na síntese da insulina nas células β do pâncreas^{89,98,99} ou no metabolismo da glicose⁹⁷. Outros miRNAs, como o let-7, miR-103 e miR-107, influenciam a sensibilidade à insulina em roedores^{100,101}.

O ambiente de hiperglicemia ainda modula a expressão de vários genes e, possivelmente, a atuação dos miRNAs¹⁰², interferindo na função das células β ¹⁰³. A transcrição do gene da insulina, a estabilidade e a tradução do mRNA da insulina, o processamento da pré-proinsulina e a secreção da insulina são rigorosamente controlados por mudanças nos níveis da glicose

do sangue¹⁰⁴⁻¹⁰⁸. Assim, alguns miRNAs regulados pela glicose podem ter importante papel na produção e secreção da insulina.

Os miRNAs mais expressos na presença de altas concentrações de glicose são miR-30d, miR-124a e miR-107, enquanto o miR-296, miR-484 e miR-690 estão reprimidos. Já o miR-30d afeta a transcrição do gene da insulina, mas não a secreção da insulina, nas células MIN6¹⁰⁹. Os autores observaram que a expressão do miR-375 não foi alterada pelas concentrações de glicose. Em contraposição, a exposição de linhagens de células secretoras de insulina e ilhotas primárias de ratos a concentrações elevadas de glicose resultou em redução na expressão de miR-375 e em aumento concomitante no nível da *phosphoinositide* dependente de proteína quinase-1, um alvo direto do miRNA que desempenha um papel central no controle da expressão do gene da insulina e na síntese do DNA ¹¹⁰.

Estudos indicam que as células β pancreáticas tem perfil de expressão própria de genes de miRNAs, que regulam a função, diferenciação e o desenvolvimento destas células¹¹¹.

O miR-124a parece atuar no desenvolvimento das ilhotas pancreáticas. Um dos genes alvos do miR-124a nas células pancreáticas é o fator de transcrição FoxA2, que regula a expressão de genes específicos das células β pancreáticas, como o *Pdx-1*, *Kir6.2* e *Sur-1* ¹¹². A expressão do miR-375, está sob o controle dos fatores de transcrição Pdx-1 e NeuroD1, os quais são críticos para o desenvolvimento do sistema endócrino do pâncreas¹¹³.

O programa computacional de predição (PicTar) sugere que os miRNA 124a e miR-375 coordenam, e o let-7b, regula o nível de miotrofina, inibindo a secreção da insulina¹¹⁴.

Qing et al. observaram que a deficiência específica de miRNAs nas ilhotas exacerba diabetes autoimune induzido por estreptozotocina, sugerindo que os miRNAs expressos nas células β regulam a sua susceptibilidade à destruição autoimune em modelos animais *knockout* para a enzima Dicer¹¹⁵.

Segundo Roggli et al. citocinas como IFN- γ , IL-1 β e TNF α , podem induzir a expressão de miR-21, miR-34a e miR-146a/b, associados à apoptose das células β e à redução da secreção de insulina estimulada pela glicose, contribuindo para o desenvolvimento do diabetes. Corroborando estes dados, estes miRNAs estão aumentados na ilhota de camundongos NOD durante o desenvolvimento do diabetes, na fase de pré-diabetes¹¹⁶.

Recentemente Van de Bunt et al. utilizando sequenciamento de última geração, estabeleceram o primeiro catálogo de miRNAs em ilhotas e em células β pancreáticas em humanos, definindo os miRNAs de interesse relacionados com a fisiologia e função das células β , e subsídios para o estudo de miRNA em diabetes tipo 2¹¹⁷.

Muitos outros miRNAs abundantes tinham níveis de expressão comparáveis entre ilhotas e células β , mas o perfil de miRNA das ilhotas e das células β era relativamente distinto do da maioria dos outros tecidos humanos como: linfócitos, fígado, células pigmentares, pool de timócitos, medula óssea, células progenitoras CD34+, pele, pulmão, rim, músculo esquelético, coração, pâncreas total, giro frontal orbital, esplenócitos, e tecido adiposo¹¹⁷.

Neste estudo, Bunt também investigou a sobreposição entre os miRNAs das ilhotas, com os estudos do diabetes tipo 2 publicados pelo GWAS, encontrando evidencia sugestiva do papel dos miRNAs na patogênese do diabetes¹¹⁷.

Os miRNAs específicos, relacionados com a função das ilhotas foram: miR-184, miR-182-5p e miR-127-3p¹¹⁷ e, em relação à biossíntese e secreção da insulina, o miR-184 e o miR-127-3p. Nestes, havia correlação entre sua expressão nas ilhotas e a secreção de insulina estimulada pela glicose^{118,119}. Para outros miRNAs transcritos, como o 409-5p e o miR-183-5p, os seus altos graus de especificidade podem apontar um papel no desenvolvimento e manutenção do fenótipo das ilhotas¹¹⁷.

Assim, estudos *in vivo* e *in vitro* em modelos animais de diabetes autoimune (camundongos NOD e diabetes induzido por estreptozotocina) têm tornado claro que os miRNAs, contribuem para a expressão gênica observada na disfunção das células β e nos tecidos resistente à ação da insulina e que, provavelmente, estão envolvidos no desenvolvimento do diabetes¹¹⁸.

No diabetes tipo 1A, por ocasião do diagnóstico, estima-se que os pacientes perderam cerca de 80-90% da massa e função das células β . Após o tratamento com insulina, é frequente um período de retomada da produção de insulina (fase de remissão), evidenciando certo potencial de regeneração das células β ¹². Frente à dificuldade de obtenção e estudo do pâncreas humanos, biomarcadores que expressem a destruição e regeneração das células β são ferramentas úteis no diagnóstico precoce da falência secretora e da resposta ao tratamento⁵⁷.

De fato, Nielsen et al. observaram em portadores de DM1A recente, 12 miRNAs com expressão aumentada no soro, associados à apoptose (miR-181a, miR-24, miR-210, miR-26a, miR-25)¹¹⁹⁻¹²², à função e regulação de células β (miR-148a, miR-24 miR-200a, miR-29a)¹²³ e outros sem função definida (miR152, miR-27a, miR-27b, miR-30a-5p)⁵⁷. O miR-25 foi associado negativamente com a função residual da célula β e positivamente com controle glicêmico, sendo considerado parâmetro de controle glicêmico e de proliferação celular das células endócrinas do pâncreas, mas não do processo de autoimunidade. Este estudo confirma o papel dos miRNAs circulantes como biomarcadores preditivos da fisiopatologia tecidual e potencial alvo de intervenção terapêutica⁵⁷.

Reiterando estes dados, Erener S. et al. observaram elevação progressiva dos níveis séricos de miR-375 em camundongos NOD, previamente à hiperglicemia, e em camundongos C57BL/6 tratados com estreptozotocina, confirmando seu papel como biomarcador sérico da morte das células β ¹²⁴.

1.5.3 miRNAs e Resposta Imune

A primeira indicação que os miRNAs podem regular a resposta imune foi relatada em 2004, mostrando a expressão seletiva do miR-142a, miR-181 e miR-223 em células do sistema imunológico¹²⁵. Neste estudo, o miR-181 foi encontrado em linfócitos B, o miR-142a em linfócitos B e células mieloides e o miR-223, em células mieloides. Estudos recentes indicam que aqueles

miRNAs que são seletivamente e/ou altamente expressos em células imunológicas, incluindo o cluster miR-17-92 e os miR-150, miR-155, miR-181 e miR-223, têm função permissiva na maturação, proliferação e diferenciação de células mieloides e linfoides¹²⁶⁻¹²⁸.

Estudos realizados por Chen et al. também demonstraram que os miRNAs são diferencialmente expressos em células imunológicas e que a superexpressão do miR-181a está associada com a redução das células T CD8⁺¹²⁵. Ambos, miR-155 e miR-181a, foram implicados na regulação da resposta aguda, seguida de ativação das células TCD4⁺⁸².

Os miRNAs (miR-9, miR-146a e miR-155) têm sido relacionados negativamente com a regulação da resposta inflamatória aguda, através de *down-regulation* de proteínas envolvidas nas vias de sinalização da indução dos seus receptores⁸².

Desde 2008, uma série de estudos têm sugerido miRNAs como candidatos a biomarcadores para inúmeras doenças, incluindo lesão hepática induzida por drogas¹²⁹, infarto agudo do miocárdio¹³⁰ e vários tipos de câncer¹³¹⁻¹³⁴. No entanto, estudos para definir miRNAs biomarcadores para uma determinada doença têm mostrado resultados variáveis, atribuídos ao estilo de vida do indivíduo, bem como ao procedimento e coleta das amostras. Outras possíveis fontes de variabilidade dos perfis de miRNAs circulantes são as diferenças analíticas, como a plataforma de quantificação ou métodos de normalização utilizados¹³⁵.

Estudos recentes demonstraram que a maioria dos miRNAs encontrados no soro e no plasma estão também presentes em células do

sangue e que a hemólise durante a coleta ou processamento da amostra pode afetar o perfil do miRNA a ser investigado^{136,137}.

Uma das principais questões a se considerar em relação aos miRNAs como biomarcadores, é que cada um dos fluidos corporais parece ter um espectro de normalidade de miRNAs, presumivelmente um reflexo da fisiologia normal. miRNAs no plasma e soro parecem contribuir para o funcionamento do sistema circulatório e imunológico^{138,139}.

A medição e a quantificação exata de miRNA são ainda dificultadas pelos baixos rendimentos de RNA em soro ou plasma, complicando estratégias de normalização, que são baseadas na quantificação de RNA total. Um dos procedimentos mais frequentemente utilizados para superar este problema utiliza um gene de referência para a normalização entre amostras, geralmente expresso normalmente em mRNA, miRNA ou outro RNA pequeno¹⁴⁰, como o RNA nucleolar RNU6B ou miR-16¹⁴¹⁻¹⁴⁴, mas por outro lado, variação significativa nos níveis destes normalizadores^{145,146}, foram observados.

Isto levou à adoção de estratégias de normalização baseadas na detecção e quantificação de miRNAs sintéticos¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

No entanto, ainda há uma falta de consenso sobre métodos de quantificação ideais e genes adequados de referência.

Por ser facilmente acessível e recolhidos rotineiramente como parte de avaliações médicas, o plasma e o soro representam uma fonte promissora de miRNAs livre de células.

1.6 Justificativa do estudo

O fato de os miRNAs estarem implicados na regulação da imunidade inata e adaptativa, e com as respostas das células T e B, sugere sua atuação em doenças inflamatórias e autoimunes.

Estudos indicam também seu envolvimento na função e formação de células endócrinas pancreáticas.

Considerando a possível associação entre marcadores inflamatórios e de função das células β no sangue periférico e no pâncreas, optamos por analisar o perfil dos miRNAs em amostras de soro de indivíduos com autoanticorpos pancreáticos e de pacientes portadores de diabetes mellitus autoimune e compará-los com indivíduos controles saudáveis.

Os miRNAs no soro são estáveis e refletem disfunção celular em várias doenças crônicas e poderão espelhar a destruição ou regeneração das células β e a atividade imunológica, constituindo biomarcadores potenciais do processo autoimune.

Esta avaliação é interessante porque permite verificarmos a expressão destes marcadores numa fase que antecede a doença, bem como, na fase em que o processo de autoimunidade ainda está ativo (até 6 meses) e após 2-5 anos da doença.

Para o estudo, foram selecionados os miRNAs implicados na expressão de genes das vias inflamatórias e secreção de insulina (Tabela 1).

Tabela 1. miRNAs associados com a diferenciação das células β , secreção de Insulina e resposta imunológica estudados no Diabetes.

miRNAs com expressão preferencialmente em ilhotas e células β pancreáticas, em humanos:	Ref
miR-184, miR-375, miR-409- 5p, miR-182-5p, miR-1468, miR-183-5p, miR-136-3p, miR-1275p, miR-370, miR-153, miR-200a-5p, miR-7-5p, miR-410, miR-889, miR-668, miR-6545p, miR-216a, miR-376a-5p, miR-204-5p, miR-381, miR-411-5p, miR-1179, miR-493-5p, miR-212-3p, miR-132-3p, miR-141-3p, miR-493-3p, miR-1180, miR-429, miR-27b3p, miR-148a -5p, miR-125b-1-3p, miR-582-5p, miR-129-5p, miR-671-5p, miR-200a-3p, miR-148a-3p, miR-181c-5p, miR-323b-5p, miR-141-5p, miR-369-5p, miR-190b, miR-134, miR-194-5p, miR-3065-5p, miR-340-3p, miR-132-5p, miR-148b-3p, miR-744-5p, miR-720, miR-200b-3p, miR-577, miR-151, miR-301a-3p, miR-95, miR-30d-3p, miR-1260a, miR-1260b, miR-130b-5p, miR-1299, miR-432-5p, miR-4446-5p, miR-92b-3p, miR-98, miR-99b-5p, miR-4286, miR-484, miR-377-5p, miR-135a-5p, miR-338-5p, miR-30d-5p, miR-500a-3p, miR-487b, miR-1275, miR-3825p, miR-136-5p, miR-200b-5p, miR-708-3p, miR-589-5p, miR-379-5p, miR-96-5p, miR-421, miR-361-5p, miR-423-5p, miR-26a-5p, miR-186-5p, miR-3184-5p, miR-542-5p, miR-28-5p, miR-27b5p, miR-323, miR-22-3p	
miR- 9 e miR126: agem no desenvolvimento do pâncreas	117
miR-7, miR-9, miR- 375, miR-376: específicos das ilhotas e expressos no desenvolvimento do pâncreas.	96,111
miR-338 : expansão das células β pancreáticas	86,87 103,111
	172
miRNAs que sofrem influência das alterações glicêmicas	
Soro	
miR-25: no soro- relação positiva c/ controle da glicose	
Células	
miR-124a, miR-107, miR-30d, miR-133, miR-30a-5p, miR-15a, miR-335, miR-374 expressão $\uparrow$ em células MIN6 ou células beta pela hiperglicemia	57
miR-21a: expressão $\uparrow$ em PBMC pela hiperglicemia	109,110,
miR-690, miR-296, miR-484, miR-612, miR-638, miR-663, miR-146, miR-15b: expressão $\downarrow$ em células MIN6 ou células beta pela hiperglicemia	157 61
miR-375 : não se altera com hiperglicemia cels MIN 6	109,118, 157
reduzidos em Treg no lúpus : $\uparrow$ miR-132, miR-184, miR-199a-3p, miR-203 e miR-383	109
	172

Continua

Continuação da Tabela 1

miRNAs que influenciam a biossíntese , secreção, sensibilidade e resistência à insulina	
miR-103,miR-107: ↓sensibilidade à insulina em adipócitos	100
Lin28a,Lin28b:sensibilidade à insulina –músculo	101
miR-29a ,miR-29b, miR-96 :resistência à insulina / ↓ secreção da insulina	
let-7 : resistência à insulina / ↑ secreção da insulina	96,151
miR-15a, miR-21, miR-33a, miR-34a, miR-96, miR-124a, miR-335,miR-375, miR-24,miR26, miR-148a, miR-182,miR-30d, miR-200, miR-29,miR-126: relacionados à síntese e secreção de insulina.	152
miR-132: ↑ secreção insulina induzida por glicose e proliferação células β	112,150, 153
miR-199a -5p: ↓ conteúdo insulina ; ↑ apoptose	172
↓ miR-184: ↑ proliferação células β	172
↓miR-203, miR-210 e miR-383: ↑ apoptose células β	172
	172
miRNA envolvidos em modelo de diabetes(NOD) e autoimunidade Soro	
miR-375: ↑ no soro de camundongos NOD pré-diabéticos e camundongos C57BL/6 tratados com STZ	124
miR-9,miR-31,miR-34a,miR-146a,miR-181a,miR-199,miR-155: alterados em pacientes DM1 recente	154
miR-152, miR-30a-5p, miR-181a, miR-24, miR-148a, miR-210 , miR-27a, miR29a, miR26a, miR-27b, miR-25, miR-200a: alterados em pacientes DM1 recente Células	57
miR-7a* ,miR-669h-5p, miR-712, miR-24-2*, miR-125a-3p,mcmv-miR-M23-1-5p : induzidos em linfócitos de NOD	155

Continua

Continuação da Tabela 1

miRNA envolvidos em modelo de diabetes(NOD) e autoimunidade	
let-7f, miR-181c,miR-128, miR-301a, miR-494, miR-200b, miR-363,miR-101b,	155
miR-18a : induzidos em timócitos NOD	155
miR-139-5p, miR-223, miR-29a*, miR-101a, miR-29b*,miR-146a, miR-150,	
miR-342-3p, miR-30b: reprimidos em timócitos NOD	
miR-33,miR-33a: reprimidos em linfócitos NOD	155
 miR- 21,miR-34a , miR-146a/b: (NOD tem aumento progressivo destes miR's em células	116
MIN6 antes do aparecimento do diabetes)	156
miR-9a/b/c ↑ NOD	116
miR-21,miR-34a,miR-146a : são induzidos por citocinas inflamatórias no NOD e seu bloqueio impede a redução da secreção de insulina e morte celular	116
miR-21 (célula beta): favorece diabetes em NOD	157
 miR-191: reduzido em Treg DM1	158
miR-196a, miR-17-5p, miR-409-3p, miR-141, miR-383,miR-112, miR-184 :	
↑ em PBMC no	158
lúpus	158
 miR-189,miR-61,miR-78,miR-21,miR-142-3p,miR-342, miR-299-3p,miR-198,miR-298:	158
↓ em PBMC no lúpus	8
let-7a,let-7f ,miR-16,miR-23,miR-23b,miR-27b,miR-27a,miR-510,miR-155:	
↑ em Treg no lúpus miR-191, miR-342: reduzidos em Treg no lúpus	
 miR-181a,miR-181b,miR-146 ,miR-126, miR-155, miR-150-resposta imunológica	159
miR-302a, miR-523: regula resposta imunológica	160
miR-16-2,miR-551b,miR-887: regula resposta imunológica	161
miR-510 : regula resposta imunológica	153
 miR-326, miR-214, miR-517a/c (estimula via NF-kB: resposta imunológica)	159,162,163
 miR-17- 92 cluster: ↑ linfócitos B e T ; diferenciação neutrófilos miR-599: relapso de MS	82,159,164
	162

Continua

Continuação da Tabela 1

miRNAs relacionados com autoimunidade e inflamação	
miR-142-3p, miR-181a : ↑ no lúpus - plasma	165
miR-148a: ↑ no lúpus	163
miR-106a, miR-17, miR-20a, miR-92a, miR-203 : ↓ no lúpus- plasma	165
miR-146: ↓ expressão de anticorpos no lúpus	163
miR-155: ↑ em artrite reumatoide –fibroblastos sinóvia	160
miR-326 : ↑ em linfócitos , principalmente T _H 17 de esclerose múltipla	166
miR-326 : ↑ em linfócitos de DM1 c/ anticorpos positivos	167
miR-146 : ↑ na artrite reumatoide- leucócitos de sangue periférico	168
miR-24, miR-27a, miR-29a, miR-291, miR-148a, miR-200a: ↑ soro DM1	57
miR-155, miR-181 : controla o desenvolvimento de linfócitos B . Promove diferenciação de Th1 e Th 17	163,169
miR-182: regula a expansão clonal das céls T	162
miR-125a: controla a resposta imune inata	163
miR-223: reduz proliferação e ativação de Neutrófilos	163
miR-27a : ↑ IL-10 e diferenciação de Treg e inibe a diferenciação de T _H 1 e T _H 17 induzida por céls dendríticas.	170
miR-146a : ↓ no sangue no lúpus	163
miR-21a e miR-93: ↓ expressão em PBMC de pacientes DM1	61
miRNAs relacionados com apoptose	
miR-21a: favorece apoptose via NF κ B	61
miR-29a/b/c: promovem apoptose céls β	156
miR-21, miR-34a, miR-146a:proteção contra apoptose por citocinas	116
miR-296-3p: ↓ protege de apoptose induzida por citocinas inflamatórias.	171

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de miRNAs séricos relacionados com a resposta imunológica e a função das células β pancreáticas e sua implicação na patogênese do diabetes tipo 1 autoimune. Foram estudados 4 grupos de indivíduos:

- portadores de diabetes mellitus tipo 1 autoimune com diagnóstico recente (DM1A recente) até 06 meses;
- portadores de diabetes mellitus tipo 1 autoimune com duração de 2-5 anos (DM1A 2-5 anos);
- portadores de autoanticorpos pancreáticos sem diabetes(AcP)
- controles saudáveis

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar e comparar o perfil de expressão diferencial de miRNAs, nos 4 grupos de estudo;
- Determinar os alvos dos miRNAs diferencialmente expressos nos 4 grupos por ferramentas de bioinformática.

3 METÓDOS

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

A casuística do presente estudo foi formada por quatro grupos experimentais assim descritos: (1) DM1A recente: pacientes recém-diagnosticados com diabetes tipo 1 autoimune (duração ≤ 6 meses) (n=30); (2) DM1 2-5 anos: pacientes portadores de DM1A, com 2 a 5 anos do diagnóstico (n= 26); (3) AcP: indivíduos portadores de autoanticorpos antiantígenos pancreáticos sem diabetes (n=25); (4) Controle: indivíduos saudáveis (n=29) (ANEXOS A, B, C, D, E e F).

A seleção dos pacientes portadores de diabetes tipo 1 autoimune obedeceu aos critérios estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Diabetes para DM1A com destaque para a hiperglicemia grave ou cetoacidose ao diagnóstico, início precoce de insulinoterapia e presença de um ou mais autoanticorpos pancreáticos.

Indivíduos controles saudáveis, apresentavam glicemia de jejum (70-99mg/dL) e hemoglobina glicada – Hb1Ac (inferior a 5,7%) normais e ausência de histórico familiar de diabetes tipo 1 autoimune ou qualquer doença autoimune. Os indivíduos com anticorpos pancreáticos eram familiares dos portadores de DM1A na sua grande maioria ou indivíduos saudáveis que participaram da pesquisa.

Os critérios de não inclusão estabelecidos no presente estudo foram indivíduos portadores de diabetes de origem não autoimune e portadores de doenças hepática, renal, tireoidiana, inflamatória e autoimune.

Após orientações contidas na Declaração de Helsinki e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1) pelos participantes do estudo, as amostras de soro foram coletadas e armazenadas em freezer -70°C - Banco de DNA e soro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

A aprovação da Plataforma Brasil encontra-se no Apêndice 2.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPEsq da Diretoria Clínica do HC-FMUSP (nº 11601). (Apêndice 3)

3.2 Coleta de Sangue Periférico e Preparação do Soro

O sangue periférico foi coletado em tubos BD Vacutainer® SST® II Advance® de 5mL contendo ativador de coágulo na parede do tubo, o qual acelera o processo de coagulação, e gel separador para obtenção de soro com a mais alta qualidade, proporcionando melhor eficiência no processo de trabalho. Após a coleta, o tubo ficou em descanso por 30min em temperatura ambiente, para retração do coágulo e em seguida submetido à centrifugação sob força de 2000x g a 4°C durante 10min. O sobrenadante (soro) foi transferido, em dois tubos de 2,0mL livres de RNase/DNase e armazenado em freezer -70°C até o momento da extração de RNA.

3.3 Controle de Qualidade das Amostras de Soro-Avaliação da Hemólise por Espectrofotometria

Estudos recentes demonstraram que a maioria dos miRNAs encontrados no soro e no plasma estão também presentes em células do sangue e que a hemólise durante a coleta ou processamento da amostra pode afetar o perfil do miRNA a ser investigado^{173,174} Todas as amostras de soro dos indivíduos arrolados no estudo foram avaliadas quanto à presença da hemoglobina livre (absorbância A414nm) utilizando-se espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Foram consideradas aptas para extração do material genético, a saber o RNA total incluindo os microRNAs, somente as amostras com valores de absorbância $\leq 0,2$.

A quantificação exata dos miRNAs é ainda dificultada pelos baixos rendimentos de RNA em soro ou plasma, complicando estratégias de normalização que são baseadas na quantificação de RNA total. Justifica-se a utilização de um gene de referência para a normalização entre amostras, geralmente expresso normalmente em mRNA, miRNA, outro RNA pequeno⁹¹ ou miRNAs sintéticos¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

3.4 Medidas de controle – processamento das amostras

A fim de minimizar os riscos de contaminação no processamento das amostras, estas foram manipuladas em fluxo laminar livres de amplicons, previamente tratado com uma solução RNaseZap® -AM 9780 (Thermo

Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Todos os materiais e reagentes envolvidos no processo eram *RNAses /DNAses.-free* e os reagentes, quando necessário, alíquotados para evitar diversos ciclos de congelamento e descongelamento.

3.5 Extração do RNA Total no Soro, incluindo os miRNAs

As amostras foram retiradas do freezer -70°C, descongeladas no gelo e, em seguida, submetidas à extração do RNA total, utilizando o kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante.

Um mililitro de Qiazol Lysis Reagent foi adicionado a 200µL de soro, homogeneizados vigorosamente por 10s e incubados por 5min à temperatura ambiente (15-25°C). Após incubação, a fim de monitorar a eficiência da extração do RNA total, foi adicionado 3,5µL de uma solução do miRNA-39 sintético (*Caenorhabditis elegans* -cel-miR-39; Qiagen, Alemanha) na concentração de $1,6 \times 10^8$ cópias/µl como controle “*spike-in*”.

Em seguida, foram adicionados 200µL de clorofórmio (Merck- Alemanha), homogeneizados vigorosamente por 15s e incubados por 3min à temperatura ambiente (15-25°C). Após este período, as amostras foram submetidas, por 15min, à centrifugação sob força de $12.000 \times g$ a 4°C, para a obtenção das fases orgânica (inferior) e aquosa (superior). A fase aquosa, a qual contém o RNA total, foi transferida para outro microtubo eppendorf de 1,5mL, livre de nucleases e acrescida de um volume de 1,5x de etanol PA (Merck- Alemanha), para a precipitação do RNA. Após homogeneização, transferiu-se 700µL da solução para a coluna RNeasy MinElute spin (Qiagen-

Alemanha), seguida de centrifugação a 8.000 x g à temperatura ambiente (15-25°C) por 15s. As etapas seguintes consistiram em lavagens da coluna com tampões específicos, RWT e RPE.

Por fim, o RNA foi eluído com 14µL de água livre de nucleases (Qiagen-Alemanha), por centrifugação a 8.000 x g por 1min.

As amostras do RNA total, incluindo os miRNAs foram armazenadas em freezer -70°C até o momento de sua utilização.

3.6 Determinação da Concentração do RNA Total

Rotineiramente, a qualidade e a concentração do RNA são medidas por espectrofotometria ultravioleta (UV); porém, sabe-se que o rendimento de RNA a partir de pequenos volumes (100-400µL) de plasma ou soro estão abaixo do limite de quantificação acurada. A inclusão dos *spike-in* torna-se importante para ajustar as diferenças de eficiência da recuperação de RNA entre amostras¹⁷⁸

As amostras do RNA total do estudo foram quantificadas por espectrofotometria -NanoDrop ND-2000 (A260/A280) (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Para a realização da reação de transcrição reversa, fixamos previamente, uma mesma concentração final para todas as amostras, levando em consideração a amostra que apresentava menor concentração, bem como um volume fixo de 3 µL do RNA total, de acordo com o protocolo do fabricante.

3.7 Reação de Transcrição Reversa (RT)

A reação de transcrição reversa foi realizada por meio de kits específicos, *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante a fim de se obter o DNA complementar (cDNA), etapa necessária para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qRT-PCR) utilizando posteriormente os ensaios, *TaqMan® MicroRNA Assays* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

Para a reação da transcrição reversa de cada amostra foram utilizados tubos eppendorf de 0,2mL, com volume final de 7,5 µL, sendo 3µL do RNA total e 4,5µL do mix RT, que consistiu de: 0,8µL Megaplex™ RT Primers(10x), 0,20µL dNTPs (100mM), 1,5µL enzima *MultiScribe™* Reverse Transcriptase (50U/µL), 0,8µL Buffer RT (10x), 0,9µL MgCl₂(25mM), 0,10µL RNase *inhibitor* (20U/µL) e 0,20µL de água livre de nucleases. Em seguida, foram submetidos a 40 ciclos a 16°C por 2min; 42°C por 1min e 50°C por 1s, seguidos por extensão a 85°C por 5min, finalizando a 4°C, no Termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

Posteriormente à etapa da transcrição reversa, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C até o momento da pré-amplificação, processo necessário por se tratar de amostras circulantes, com baixa concentração de RNA.

3.8 Reação de Pré-Amplificação

Os produtos da reação de transcrição reversa foram pré-amplificados, de acordo com o protocolo do fabricante- *Megaplex™ pools for microRNA Expression Analysis* (PN 4399721) num volume final de 25µL, consistindo em 2,5µL do produto RT acima descrito e 22,5µL do mix de pré-amplificação, constituído por 12,5µL do reagente TaqMan® Pré Amp Master Mix (2x), 2,5µL do reagente Megaplex™ Pré Amp Primer's (10x) Human Pool A v2.1 e 7,5µL de água livre de nucleases.

Em seguida, foram submetidos aos seguintes estágios de ciclagem: 95°C por 10min; 55°C por 2min; 72°C por 2min, seguidos por 12 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 4min, etapa de extensão de 99,9°C por 10min e finalizando a 4°C, no Termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

As amostras pré-amplificadas foram armazenadas em freezer -20°C, até o momento do uso.

3.9 Descrição da Placa TLDA (TaqMan® Low Density Array- Card A)

Para identificação do perfil dos miRNAs foi utilizada a placa comercial TLDA - *TaqMan® Low Density Array- Card A v2.0* para humanos, composta por 384 microRNAs, (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), sendo 377 miRNAs alvos e 4 genes controles (PN 4398965). É constituída por microRNAs maduros e altamente caracterizados, relatados em humanos e descritos em Banco de Dados Sanger miRBase

(<https://microrna.sanger.ac.uk>). As análises foram realizadas por RT-qPCR (Transcrição Reversa seguida pela Reação quantitativa da PCR em Tempo Real).

Foram executadas 110 placas TLDA Card A, perfazendo os 4 grupos de estudo propostos. A relação dos miRNAs avaliados, incluindo os microRNAs que foram pré-selecionados (Tabela 1), de acordo com a proposta do estudo, marcados em negrito, está na (Anexo A). Utilizamos 01 placa TLDA para cada indivíduo.

3.10 Quantificação Relativa da Expressão dos miRNAs - (RT-qPCR)

Nesta reação da PCR em Tempo Real, foram utilizadas sondas de hidrólise TaqMan® e pares de *primers TaqMan® MicroRNA Array* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) com especificidade para a sequência de cDNA dos miRNAs alvos.

Nesta placa, os *wells* são conectados através de canais microfluídicos, (Figura 2) por onde foram introduzidos 100µL do *master mix* contendo o cDNA e os reagentes de PCR, conforme descrito a seguir: 6µL do produto pré-amplificado, 450µL do reagente TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG, 2x e 444µL de água livre de nucleases, perfazendo 900µL, que foram distribuídos nos 8 canais microfluídicos. A seguir, a placa foi centrifugada em duas etapas sequenciais de 1min a 1.200rpm em temperatura ambiente, de modo que as amostras foram distribuídas com volume final de 1µL de forma homogênea por *well*. Após a centrifugação,

fazendo uso de equipamento específico, a placa foi selada para evitar o refluxo das amostras e as canaletas, removidas.

Figura 2. Placa TLDA

A Reação de PCR em Tempo Real foi realizada na plataforma QuantStudio12K Flex (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), seguindo as condições de ciclagem: 95°C por 10min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min, finalizando a 4°C. Todas as etapas de execução das reações da RT-qPCR foram realizadas no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração (INCOR).

3.11 Análise da Expressão do Perfil dos microRNAs

As análises das reações de expressão gênica foram realizadas no programa *Cloud* (Thermo Fisher Scientific), que é um Software de análise de dados online, que utiliza a método comparativo C_T^{179} .

O *threshold* foi alinhado manualmente, quando havia captação de ruídos. Os critérios escolhidos para validação das reações da RT-qPCR foram: curvas de amplificação em fase exponencial e com platô determinado. Selecionamos os miRNAs expressos em 20% ou mais das amostras amplificadas, com C_T até 36. Valores de $C_T > 36$ foram considerados indeterminados.

A expressão relativa dos miRNAs, foi obtida pelo método comparativo do C_T ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), utilizando normalização global e representada por *Fold Change* (FC), que representa quantas vezes o miRNA está mais expresso em relação ao controle. Valores acima de 1 foram considerados aumentados e abaixo de 1 (entre zero e 1), diminuídos. Os *outliers*, foram omitidos.

3.12 Ensaios Individuais -TaqMan®microRNA Assays

Foram realizados ensaios individuais para 03 miRNAs, selecionados no estudo piloto: hsa-miR-101-3p (assay ID 002253) e hsa-miR-204-5p (assay ID 000508), e o gene normalizador da reação, o miRNA sintético (cel-miR-39 – assay ID 000200). Esta etapa dos ensaios individuais, seguindo o protocolo do fabricante para pré-amplificação, iniciou-se com o preparo da reação da transcrição reversa (RT) com o *pool* de *primers* RT, conforme descrito a seguir: utilizamos 10µL de cada *primer* perfazendo volume de 30µL q.s.p 1000µL de água livre de nucleases. Em seguida, realizamos a reação de transcrição reversa em tubo de 0,2mL com os seguintes componentes: 6,0µL pool de primer RT; 0,3µL dNTP; 3,0µL enzima MultiScribe 50U/L; 1,5µL Buffer 10x; 0,19µL RNA inibitor e 1,01µL, perfazendo volume de 12µL de mastermix

e adicionamos 3µL do RNA total, com volume final de 15µL. A reação foi processada em Termociclador Veriti® (Applied Biosystems - EUA), com apenas um estágio: ciclagem 16°C por 30 minutos; 42°C por 30min; 85°C por 5min, finalizando a 4°C. A seguir, prosseguimos com a reação de pré-amplificação, sendo: 2,5µL do produto RT; 12,5µL TaqMan Pré-Amp MMix 2x; 3,75µL pool primer Pré-Amp e 6,25µL água livre de nucleasse, com volume final 25µL.

A reação de pré-amplificação foi processada em Termociclador Veriti® (Applied Biosystems- EUA), em três estágios, com a seguinte ciclagem: 95°C por 10min; 55°C por 2 minutos; 72°C por 2min, seguidos por 12 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 4min, seguidos de 99,9°C por 10min, finalizando a 4°C.

3.13 Quantificação Relativa dos níveis dos miRNAs no Soro

A quantificação relativa da expressão no soro do miR-101-3p, miR-204-5p e do controle *spike-in* (cel-miR-39), foi mensurada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), utilizando o kit TaqMan® MicroRNA Assays 20x (Thermo Fisher Scientific), com sondas específicas e inventoriadas para hsa-miR-101-3p (assay ID 002253), hsa-miR-204-5p (assay ID 00508) e cel-miR-39 (assay ID 000200). As reações de qPCR, foram padronizadas e os ensaios realizados em duplicata. Cada reação consistiu em 1,0µL TaqMan® MicroRNA Assays 20X (sonda específica); 5,0µL TaqMan® Universal Master Mix II No AmpErase® UNG 2X; 3,0µL água livre de nucleases e 1,0µL produto pré-amplificado, totalizando volume final de 10µL/*well*. As reações foram plotadas em placas de 384 poços

(MicroAmp® Optical 384-well ReaCTion Plate with Barcodes- Thermo Fisher Scientific, EUA) e otimizadas na plataforma QuantStudio™ 12K Flex (Thermo Fisher Scientific, EUA), com a seguinte ciclagem: 95°C por 10min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min, finalizando a 4°C. Para maior confiabilidade dos dados, todas as reações foram realizadas em duplicata, incluindo o controle *spike-in*. Os dados foram analisados no software QuantStudio™ 12K Flex v1.2.2 (Thermo Fisher Scientific, EUA) e no Excel 2010 (Microsoft, EUA). A quantificação de cada miRNA foi calculada pelo ΔCT , representado pela diferença de expressão entre o gene alvo e o controle endógeno, no caso o miR-39. Os valores da expressão relativa dos miRNAs foram obtidos por meio do cálculo comparativo de C_T ($2^{-\Delta\Delta CT}$), seguindo a fórmula a seguir:

$$\Delta CT = CT (\text{gene alvo}) - CT (\text{gene calibrador})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{gene alvo}) - \Delta CT (\text{gene referência})$$

Os resultados foram expressos em *Fold Change*(FC) ¹⁷⁹.

3.14 Análises Bioquímicas

3.14.1 Glicemia

O sangue periférico foi coletado em tubos BD Vacutainer® SST® II Advance® de 5mL para obtenção de soro e posterior determinação da glicemia. Utilizou-se método enzimático colorimétrico “Sistema Glicose Oxidase-Peroxidase de acordo com kit comercial (Labtest God-Ana – Brasil).

Foram considerados normais os valores de glicemia entre 70-99mg/dL.

3.14.2 Hemoglobina Glicada

A HbA é a forma principal e nativa da hemoglobina, sendo que a HbA0 é o principal componente da HbA. Por outro lado, a HbA1 total corresponde às formas de HbA carregadas mais negativamente devido à adição de glicose e outros carboidratos.

Existem vários subtipos distintos de HbA1. A fração HbA1c, ou apenas A1C, é a que se refere à hemoglobina glicada propriamente dita e corresponde a 80% da fração glicada. A glicose liga-se ao aminoácido valina da porção N-terminal da cadeia beta da hemoglobina por meio de uma ligação estável e irreversível.

Valores acima ou iguais a 6,5%, obtidos por um método certificado pelo NGSP (*National Glycohemoglobin Standardization Program*), quando confirmados numa segunda ocasião, fazem o diagnóstico de *diabetes mellitus*.¹⁸⁰ Indivíduos com valores de 5,7% a 6,4% são classificados no grupo de pré-diabetes e teriam risco aumentado para desenvolver diabetes.¹⁸⁰

O sangue foi obtido por punção venosa utilizando tubos 5mL- BD Vacutainer®, contendo o anticoagulante EDTA. As amostras foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), por troca iônica- Variant II turbo - método certificado pelo NGSP (*National Glycohemoglobin Standardization Program*), no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.14.3 Peptídeo-C

A dosagem de peptídeo-C foi realizada pelo método de eletroquimioluminescência (CORELAB).

Valor de referência: 1,1 a 4,4ng/mL.

3.14.4 Autoanticorpos Pancreáticos

As determinações dos anticorpos anti-GAD65 e anti-IA2 foram realizadas por radioimunoensaio (RSR-Limited, UK). Nesta técnica, incubou-se o soro dos indivíduos com o antígeno recombinante (GAD65 ou IA2), marcado com o I^{125} , sob temperatura ambiente (para anti-GAD65) e a 4°C (para anti-IA2) por 16-24h.

Em seguida, tratou-se os complexos antígeno-anticorpo com suspensão de proteína A. O imunocomplexo marcado agregado foi separado por centrifugação e a quantificação de I^{125} , presente no precipitado contendo o imunocomplexo, realizada em contador Gamma automático (Cobra II, PerkinElmer).

A partir da curva padrão realizada nesse mesmo ensaio, quantificou-se, por extrapolação, os anticorpos.

Os valores normais (considerando três desvios padrões) foram: ≤ 25 UI/mL para antiGAD65 e ≤ 125 UI/mL para o antiIA2, em 787 indivíduos saudáveis, e os coeficientes de variação intra e inter-ensaio, de 3 e 5,5% para anti-GAD65 e de 4,3% e 3,4%, para anti-IA2, respectivamente.

Em relação ao anticorpo anti-insulina (IAA), as determinações quantitativas foram também feitas por radioimunoensaio em

quadruplicata. Incubou-se 0,05mL de soro dos indivíduos com insulina humana marcada com I¹²⁵ de alta atividade específica (10.000 a 15.000cpm) (Amersham Pharmacia Biotech). Em dois dos quatro tubos utilizados, acrescentou-se 10mU/mL (quantidade em excesso) de insulina humana “fria” (não marcada com radioatividade). Após 48h de incubação, o complexo antígeno-anticorpo foi separado por centrifugação após tratamento com polietilenoglicol. A contagem de radioatividade do precipitado foi feita em contador Gama automático (PACKARD-COBRA auto gamma). A capacidade ligante de insulina do soro do paciente foi determinada considerando a contagem radioativa do precipitado na presença e ausência de insulina “fria”.

No “#4 Proficiency Program” (LAB ID# 275) nossa metodologia obteve 100% de validade, consistência, sensibilidade e especificidade. Os valores de anticorpo anti-insulina (IAA) medidos pela capacidade ligante do soro em indivíduos normais foi menor ou igual a 100nU de insulina ligada por mL de soro, considerando-se 3 desvios padrões. O coeficiente de variação inter-ensaio foi de 21%.

Quanto ao anticorpo anti-ZnT8, as determinações foram feitas por imunoensaio enzimático (ELISA) utilizando-se o kit *Zinc Transporter 8 (ZnT8) Autoantibody* ELISA (Kronus, EUA).

As amostras de soro ou padrão de anticorpos anti-ZnT8 foram incubadas a 4 °C, durante 16- 20h, em microplacas tratadas com antígeno ZnT8. O sistema de detecção é tipo sanduíche, com os anticorpos da amostra que, quando presentes, se ligam aos antígenos presentes na superfície de cada poço da placa. Após o tempo necessário para a captura dos anticorpos,

realizam-se lavagens para retirada de produtos não ligados na superfície. Após a adição do antígeno ZnT8, marcado com Biotina, a presença de anticorpos anti-ZnT8 é revelada, indiretamente, numa reação enzimática estreptavidina-peroxidase na presença de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) adicionado nos poços. A leitura do produto colorido é proporcional à presença do anticorpo na amostra que ficou ligado, especificamente, ao ZnT8 da placa, na primeira incubação (16-20 h). A quantificação das amostras é realizada em fotômetro ajustado ao comprimento de onda em 450nm. Uma curva padrão com concentrações crescentes (10, 20, 75, 500 e 2.000UI/mL) é construída na mesma placa.

A proteína do ZnT8 é codificada pelo gene *SLC30A8* e os polimorfismos no códon para o aminoácido na posição 325 resultam na expressão de três variantes da proteína: Arginina (R) 325, Triptofano (W) 325 e, raramente, Glutamina (Q) 325. Os autoanticorpos do transportador do zinco (ZnT8) são dirigidos principalmente para o domínio terminal C do ZnT8 (resíduos 268-369).

Este ensaio deteCTa e quantifica anticorpos específicos para R325, W325 e resíduo 325 de variantes não-específicas. O valor normal do ZnT8A em 321 indivíduos foi definido como $\leq 16\text{UI/mL}$.

3.14.5 Genotipagem do sistema HLA DR-DQ (genérico e subtipagem)

O DNA genômico foi isolado de leucócitos de sangue periférico, pelo método convencional do "salting out"¹⁸¹ Os alelos HLA-DRB1 e -DQB1 foram genotipados usando o sistema: Micro SSPTM Allele Generic and Specific HLA class II DNA LabType SSO typing system (One-Lambda, INC., USA).

3.15 Análise da expressão diferencial do perfil dos miRNAs por Bioinformática

Esta teve por objetivo identificar os principais miRNAs diferencialmente expressos em relação aos controles saudáveis.

Para tal, os dados provenientes do *Software Cloud*, foram importados para o projeto R para computação estatística (Versão 3.4.3 *Kite-Eating Tree*) utilizando o ambiente de desenvolvimento integrado (do inglês, *Integrated Development Environment*) *RStudio* (versão 1.1.383). Os pacotes utilizados na análise foram o *limma* (versão 3.34.5) e *HTqPCR* (versão 1.32.0, modificado pelo usuário para correção de erros), adquiridos através do software de distribuição livre Bioconductor (versão 3.6) usando BiocInstaller (versão 1.28.0).

Os dados foram importados para o ambiente *R* por meio do pacote *HTqPCR*, o qual fornece uma interface de leitura de arquivos específicos ou tabelas liberadas por equipamentos de *qPCR* através do comando (*readCTData*), além de sua normalização (comando *normalizeCTData*) e análise integrativa com o pacote *limma* (comando *limmaCTData*). O pacote *HTqPCR* também fornece métodos de geração de QC, como *PCA Plots*, *CT heatmap* e *CT density line plot*, entre outros.

A *quantile normalization* é utilizada para normalizar as distribuições dos dados por meio das técnicas de ordenação e ranqueamento das médias aritméticas das distribuições da menor para a maior, comumente utilizada na normalização de dados genômicos.

Os dados normalizados submetidos ao *limma* foram separados nos quatro grupos de estudo e analisados seguindo os seguintes desenhos: (1) DM1A recente *versus* Controle; (2) DM1A 2-5 *versus* Controle e (3) AcP *versus* controle e os 3 grupos *versus* controle, permitindo que o algoritmo empregado, o qual aplica testes estatísticos (como bayes e regressão linear) identificasse os principais miRNAs diferencialmente expressos entre o grupo alvo e a referência (grupo controle). A tabela gerada, contendo informações do miRNA, valor de teste t, p-valor, p-valor ajustado, delta delta CT, fold change e as médias do miRNA dentro do grupo alvo e grupo referência foi analisada.

3.16 Predição dos alvos e vias dos miRNAs

As interações miRNA-mRNA preditos foram examinadas através do uso do software IPA (*Ingenuity® Pathways Analysis- versão 5.0 (Ingenuity Systems- Qiagen, EUA)*), priorizando os alvos no contexto biológico de autoimunidade e função de células β pancreáticas. O IPA determina via canônicas e também as vias mais significativamente afetadas e as que estão previstas para serem ativadas ou inibidas. Analisa as vias no contexto de sinalização estabelecidas e vias metabólicas e determina quais vias se sobrepõem com base em moléculas em comum.

Utilizamos também o software *COSMIC* - the catalogue of Somatic Mutations in Cancer, *COSMIC* V83, released 07-NOV-17, para obtenção de vias previstas de sinalização.

3.17 Análise Estatística

Primeiramente, a distribuição dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal, utilizou-se análise de variância de um fator (*one-way* ANOVA) para comparar as diferenças das médias dos resultados obtidos de três ou mais grupos, seguida do pós-teste de Tukey. Dados paramétricos foram representados como média $\pm$ desvio padrão. Os dados categóricos foram representados por frequência absoluta (n) e relativa (%). Nas variáveis que não apresentaram distribuição normal *Gaussiana* utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns para comparação de três ou mais grupos. Os dados não paramétricos foram representados por mediana e quartis inferior e superior.

A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software, Inc, Califórnia, EUA). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Foram analisados 110 indivíduos distribuídos em 4 grupos, a saber: indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 1 autoimune com diagnóstico recente, até 6 meses do diagnóstico (DM1A) (n= 30); indivíduos portadores de diabetes tipo 1 autoimune, com duração de 2-5 anos (DM1A 2-5) (n= 26); indivíduos portadores de anticorpos pancreáticos positivos sem diabetes (AcP) (n= 25) e indivíduos controles saudáveis (n= 29).

Não houve diferença em relação às características demográficas, como idade, cor auto referida e sexo entre os grupos ($p>0,05$). Pacientes portadores de DM1A (recente e com duração de 2-5 anos) foram semelhantes entre si e diferiram do grupo controle pelos valores elevados de glicose, hemoglobina glicada, títulos de autoanticorpos pancreáticos, e menores de peptídeo C ($p<0,05$). Os portadores de autoanticorpos pancreáticos sem diabetes (AcP) apresentaram características intermediárias entre os grupos: menores valores de HbA1c e de anticorpo anti-tirosina-fosfatase (anti-IA2) e maiores de peptídeo C em relação aos dois grupos com DM1A. Diferiram do grupo controle apenas pelos maiores títulos de anticorpo anti-insulina (IAA) e anti-descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD65). A frequência dos alelos HLA de risco para diabetes (–DR3 ou –DR4 e –DQ2 ou DQ-8), foi maior com diabetes (DM1A recente e DM 2-5) em relação aos grupos AcP e controles. Foram considerados os alelos de risco de nossa população: HLA-DRB1*0301, -DRB1*0401/*0402/*0404/*0405, -DQB1*0201(-DQ2) e –DQB1*0302 (DQ8)¹⁸².

A Tabela 2 mostra as características demográficas e clínicas de indivíduos saudáveis (grupo controle), indivíduos portadores de anticorpos pancreáticos positivos sem diabetes (grupo AcP), indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 1 autoimune com diagnóstico recente (grupo DM1A), indivíduos portadores de diabetes tipo 1 autoimune, com duração de 2-5 anos (Grupo DM1A 2-5).

Tabela 2. Características demográficas e clínicas de indivíduos saudáveis (grupo controle), indivíduos portadores de anticorpos pancreáticos positivos sem diabetes (grupo AcP), indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 1 autoimune com diagnóstico recente (grupo DM1A), indivíduos portadores de diabetes tipo 1 autoimune, com duração de 2-5 anos (grupo DM1A 2-5)

Variáveis	Controle	AcP	DM1A	DM1A 2-5	p
Número	29	25	30	26	
Idade (anos)	16,8 (10,9-19,6)	11,8 (9,7-18,7)	13,0 (9,9-18,6)	13,3 (10,7-18,7)	
Branços (%)	68,9	62,5	86,2	76,9	
Gênero Feminino (%)	58,6	44,0	50,0	42,3	
Glicemia (mg/dL)	81 (76,5-88,0)	86 (78,2-90,7) £	113,5 (82-193) #	189 (121-287,5) \$	<0,0001
HbA1c (%)	5,2 (4,9-5,4)	5,0 (4,7-5,3) £¥	7,3 (6,7-9,1) #	8,2 (7,7-8,8) \$	<0,0001
IAA (nU/mL)	0,0 (0,0-19,7)	69,5* (24,7-75,3)	-	-	<0,0001
Anti-GAD65 (UI/mL)	0,0 (0,0-2,0)	64 (22,4-335)*	161,5 (48-477) #	43,5 (11,9-625) \$	<0,0001
Anti ZnT8 (UI/mL)	1,0 (0,0-6,0)	5,5 ¥ (3,0-412,6)	645 # (222-1.127)	48\$ (5,50-520,0)	<0,0001
Anti-IA2 (UI/mL)	0,0	12,0££	812,0#	206\$	<0,0001
Peptídeo C (ng/mL)	2,2 (1,8-3,0)	2,2 (1,3-3,0) £¥*	0,65 (0,4-1,1) #	0,2 (0,1-0,4) \$	
HLA-DR3 ou DR4 (%)	10,3	57,1*£¥	92,9 #	96 \$	
HLA-DQ2 ou DQ8 (%)	13,8	75*	89,3 #	92 \$	

Os valores são expressos em mediana (intervalo interquartil - Q25-Q75). HbA1c: hemoglobina glicada; IAA: autoanticorpo anti insulina; Anti-GAD65: autoanticorpo anti-desacarboxilase de ácido glutâmico 65; Anti-ZnT8: autoanticorpo anti- transportador de zinco-8; Anti-IA-2: autoanticorpo anti- tirosina fosfatase. HLA-DR3 ou DR4: antígeno leucocitário humano-alelos DR3, DR4, DQ2, DQ8. \$ DM2-5 vs Controle; # DM1A vs Controle; * AcP vs Controle; £ AcP vs DM1A 2-5; ¥ AcP vs DM1A; p< 0,05

4.1 Expressão dos microRNAs – Projeto piloto

Numa fase inicial do projeto, fizemos um estudo piloto com 8 indivíduos portadores de DM1A com diagnóstico recente e 8 indivíduos controles saudáveis, pareados para idade ($14,8 \pm 2,7$ vs $17,3 \pm 2,6$ anos), sexo e etnia. O grupo DM1A apresentava valores mais elevados de glicose ($140,0 \pm 62,3$ vs $76,0 \pm 10,2$ mg/dL; $p = 0,021$) e de autoanticorpos pancreáticos ($p < 0,001$). O perfil de microRNAs no soro destes indivíduos, utilizando placa TLDA Card A mostrou expressão elevada de 4 miRNAs: miR-101-3p (9,0x; $p = 0,03$); miR-204-5p (5,8x; $p = 0,01$); miR-425 (8,2x; $p = 0,02$) e miR-1276 (4x; $p = 0,04$), no grupo DM1A. Nos indivíduos controles houve maior expressão do miR-335 (3,7x; $p = 0,02$) e miR-1208 (2,4x; $p = 0,03$) (Figura 3).

Figura 3. Representação de Volcano plot demonstrando os miRNAs diferencialmente expressos nos grupos controles (indivíduos saudáveis) e indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 1 autoimune com diagnóstico recente (DM1A). Os dados são apresentados em *fold change* (eixo x) e significância estatística ($-\log_{10}$, valor de p, eixo y). Os pontos acima da linha azul indicam valor de $p < 0,05$ e os abaixo da linha $p > 0,05$.

Considerando que a maior expressão sérica do miR-101-3p, associado à inflamação¹⁵⁵ (e do miR-204-5p, presente exclusivamente nas células β ¹¹⁷ pudesse espelhar o processo patológico e a lesão tecidual, optamos por validar estes miRNAs, por ensaios TaqMan® individuais, numa maior casuística, o que descrevemos a seguir.

4.2 Ensaaios individuais de validação – Ensaaios TaqMan® RT-qPCR do miR-101-3p e miR-204-5p

Avaliamos 3 grupos no estudo: indivíduos portadores de diabetes tipo 1 autoimune recente (DM1A), até 06 meses do diagnóstico (n= 50); indivíduos com um ou mais anticorpos pancreáticos positivos, (AcP) (n= 38) e indivíduos controles saudáveis, sem história familiar de doenças inflamatórias ou auto-imunes (n= 43).

Os dados demográficos e as características clínicas dos indivíduos selecionados estão descritos na Tabela 3. Os três grupos foram pareados por idade ($p = 0,16$) e sexo ($p = 0,10$). Como esperado, os pacientes com DM1A apresentaram níveis mais elevados de HbA1c e Peptídeo C ($p < 0,0001$) quando comparados com os grupos controle saudáveis e AcP. Os níveis de glicose, que não diferiram significativamente entre os grupos DM1A e AcP, foram maiores que os do grupo Controle ($p < 0,0001$). Os pacientes com DM1A apresentaram os maiores títulos de autoanticorpos (anti-GAD65, anti-IA-2 e anti- Znt8), seguidos por indivíduos AcP, cujos títulos foram maiores do que os dos controles saudáveis ($p < 0,0001$), exceto pelo anti-IA2. A frequência de alelos HLA-DR3 ou -DR4 foi semelhante entre os grupos DM1A e AcP e maior que a do controle ($p < 0,0001$).

Tabela 3. Características clínicas e demográficas de indivíduos saudáveis (grupo controle), indivíduos portadores de anticorpos pancreáticos sem diabetes (grupo AcP), indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 1 autoimune com diagnóstico recente (grupo DM1A)

Variáveis	Controle n=43	AcP n=38	DM1A n=50	p
Glicemia (mg/dL)	77 (74 - 83)	85 (78,5 - 90,5) *	105 (77,5 - 201,5) §	<0,0001
HbA1c (%)	5,5 (5,15-5,87)	5,24 (4,88 - 5,48)	7,9(6,45 - 9,12) §, #	<0,0001
IAA (nU/mL)	0 (0 - 20)	60 (27,2 - 129,8) *		<0,0001
Anti-GAD65 (UI/mL)	0 (0 - 1,5)	42,5 (0 - 117,5)	154(58,3 - 435) §, #	<0,0001
Anti-ZnT8(UI/mL)	2,6 (0 - 6)	5,1 (1,7 - 31)	498 (37 - 856) §, #	<0,0001
Anti-IA-2 (UI/mL)	1,8 (0 - 12,5)	12 (0 - 65,5)	567,5 (192,8 - 1936) §, #	<0,0001
Peptideo C (ng/mL)	2,3 (1,7 - 3,0)	1,7 (1,1 - 2,75)	0,65 (0,48 - 1,20) §, #	<0,0001
Idade (anos)	15,82 ± 5,98	15,40 ± 8,04	13,0 ± 6,52	0,1600
Sexo (M/F)	17/26	24/14	24/26	0,1010
Alelos HLA-DR3 ou DR4	32,3%	74,1% #	88,6% §	<0.0001

Os valores são expressos em mediana (intervalo interquartil - Q25-Q75). HbA1c: hemoglobina glicada; IAA: autoanticorpo anti- insulina; Anti-GAD65: autoanticorpo anti-descarboxilase de ácido glutâmico 65; Anti-ZnT8: autoanticorpo anti- transportador de zinco-8; Anti-IA-2: autoanticorpo anti- tirosina fosfatase. HLA-DR3 ou DR4: antígeno leucocitário humano-alelos DR3, DR4. § DM1A vs Controle; # DM1A vs Abp; * AcP vs Controle p<0,05.

Obtivemos os seguintes resultados dos ensaios individuais:

Os níveis séricos do miR-101-3p foram 3 vezes maiores nos pacientes com DM1A quando comparados aos dos grupos controle e anticorpo pancreático positivo (AcP) (p = 0,0014; Tabela 4, Figura 4).

Tabela 4 - Expressão relativa dos níveis circulantes do miR-101-3p e miR-204-5p dos indivíduos com diabetes tipo 1 autoimune (DM1A) e portadores de autoanticorpos (AcP) em comparação com indivíduos controles saudáveis.

miRNA	Controle n=43	AcP n=38	DM1A n=50	p
hsa-miR-101-3p	0,87 (0,38-2,75)	0,84 (0,00-3,95)	3,00 (1,52 - 4,43)§#	0,0014
hsa-miR-204-5p	1,069 (0,23-4,32)	0,90 (0,08 -3,02)	2,195 (0,09 - 6,98)	0,2010

Os valores são expressos em mediana (intervalo interquartil - Q25-Q75).

§ DM1A vs controle p <0,05

DM1A vs AcP p< 0,05

Figura 4. Expressão relativa nos níveis séricos do miR-101-3p nos indivíduos controles saudáveis, portadores de autoanticorpos (AcP) e pacientes com diabetes tipo 1 autoimune (DM1A). *p<0,05.

A quantificação relativa (log 10 do delta CT) do miR-101-3p correlacionou-se positivamente com a do miR-204-5p no grupo controle (r=

0,490; $p = 0,001$) e no grupo AcP ($r = 0,321$; $p = 0,049$), mas não com a do grupo DM1A ($r = 0,116$; $p = 0,424$).

Por outro lado, o miR-204-5p não foi expresso diferencialmente em nenhum dos grupos testados (Figura 5).

Figura 5. Expressão relativa dos níveis séricos do miR-204-5p nos indivíduos controle saudáveis, portadores de autoanticorpos (AcP) e pacientes com diabetes tipo 1 autoimune (DM1A). Não houve diferença estatística entre os grupos.

Em uma sub-análise para o grupo AcP, avaliamos apenas os indivíduos que apresentavam dois ou mais autoanticorpos ($n=12$) (Tabela 5). Neste subgrupo, a expressão relativa do miR-101-3p foi maior que a do grupo controle ($p = 0,0022$) e não diferiu daqueles com DM1A (Figura 6).

Os valores do miR-204-5p não diferiram entre os grupos.

Este subgrupo manteve as mesmas diferenças clínicas do grupo AcP em relação aos demais, exceto pelos valores de glicose, semelhantes aos do grupo controle.

Tabela 5. Características demográficas e clínicas dos indivíduos com diabetes tipo 1, indivíduos portadores de dois ou mais autoanticorpos e indivíduos controles saudáveis

Variável	Controle n=43	AcP (2 ou mais Ac) n=12	DM1A n=50	p
Glicemia (mg/dL)	77 (74 - 83)	87 (80,75 - 94,0)	105 (77,5 - 201,5) §	0,0003
HbA1c (%)	5,5 -(5,15-5,87)	5,2 (4,70 - 5,5)	7,9(6,45 -9,12) §, #	<0,0001
IAA (nU/mL)	0 (0-20)	101,5 (51,7 – 167,3) *		<0,0001
Anti-GAD65 (UI/mL)	0 (0-1,5)	228,8 (35,6-729,4)*	154(58,3 - 435) §	<0,0001
Anti-ZnT8A (UI/mL)	2,6 (0-6)	528,5(7,82-888,0)*	498 (37 - 856) §	<0,0001
Anti-IA-2A (IU/mL)	1,8 (0 - 12,5)	168,0 (9,0 – 306,3)*	567,5 (192,8- 1936) §	<0,0001
Peptídeo C (ng/dL)	2,3 (1,7 - 3,0)	1,7 (1,1 – 3,2)	0,65 (0,48 - 1,20) §	<0,0001
Idade (anos)	15,82 ± 5,98	15,95 ± 8,11	13,0±6,52	0,092
Sexo (M/F)	17/26	09/03	24/26	0,094
HLA - DR3 ou DR4 (%)	32,3	100§*	88,6§	<0,0001
Expressão relativa				
miR-101-3p	0,87 (0,38-2,75)	3,74 (1,33-6,77) §	3,00 (1,52 - 4,43) §	0,0022
miR-204-5p	1,069 (0,23-4,32)	0,408 (0,049-3,281)	2,195 (0,09 - 6,98)	0,4318

Os valores são expressos em mediana (intervalo interquartil - Q25-Q75) ou média ± desvio padrão HbA1c: hemoglobina glicada; IAA: autoanticorpo anti- insulina; Anti-GAD65: autoanticorpo anti-descarboxilase de ácido glutâmico 65; Anti-ZnT8: autoanticorpo anti- transportador de zinco-8; Anti-IA-2: autoanticorpo anti- tirosina fosfatase. HLA-DR3 ou DR4: antígeno leucocitário humano-alelos DR3, DR4. § DM1A vs Controle; #AcP vs DM1A; *AcP vs Controle.

Figura 6. Expressão relativa nos níveis séricos do miR-101-3p nos indivíduos controles saudáveis, portadores de 2 ou + autoanticorpos pancreáticos (AcP) e pacientes com diabetes tipo 1 autoimune (DM1A). *p<0,05.

Durante o seguimento, 9 indivíduos do grupo AcP evoluíram para DM1A e seus dados evolutivos são apresentados na Figura 7. Os níveis de glicose, os títulos de autoanticorpos pancreáticos e a expressão relativa do miR-101-3p antes e após o diagnóstico do DM1A são apresentados e evidenciam níveis de miR-101-3p e de auto-anticorpos elevados na progressão do diabetes. (Figura 7).

Figura 7. Indivíduos portadores de anticorpos pancreáticos positivos que evoluíram para o diabetes tipo1 autoimune (DM1A). Tempo 0 indica o diagnóstico do DM1A. **A.** Níveis de concentração de glicose; **B.** Expressão relativa de miR-101-3p; **C.** Título de autoanticorpo anti-transportador de zinco-T8; **D.** Título de autoanticorpo anti-tirosina fosfatase; **E.** Título de autoanticorpo anti-descarboxilase de ácido glutâmico 65; **F.** Título de autoanticorpo anti- insulina.

4.3 Correlações da expressão de hsa-miR-101-3p com parâmetros fisiopatológicos do DM1A

Não houve correlação entre a expressão normalizada ($\log_{10}$) do miR-101-3p e miR-204-5p com níveis de glicose e HbA1c em nenhum grupo. Encontramos correlação positiva de miR-101-3p com títulos de anti-IA-2 no grupo AcP ($r = 0,344$; $p = 0,04$). Correlação negativa do hsa-miR-101-3p com idade ($r = -0,474$; $p = 0,001$) foi observada apenas no grupo controle.

4.4 Alvos potenciais e vias reguladas pelo miR-101-3p no DM1A

Através do software IPA, foram identificados 726 genes relacionados ao hsa-miR-101-3p, considerando os alvos altamente preditos de miRNA e experimentalmente validados. As vias canônicas mais significativamente enriquecidas são mostradas na Figura 8, sendo, a de maior expressão, a de sinalização do fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e do proto-oncogene MET (receptor de HGF).

Figura 8. Vias canônicas potenciais enriquecidas no diabetes tipo1 autoimune.

A Figura 9 mostra as vias adicionais que podem ser patogeneticamente relevantes no diabetes tipo1 autoimune.

Figura 9. Vias adicionais que podem ser patogenicamente relevantes no diabetes tipo1 autoimune.

4.5 Perfil de expressão dos microRNAs

Foram avaliados 377 miRNAs e, dentre estes, apenas 135 estavam expressos em 20% ou mais das amostras dos quatro grupos de estudo. Cinquenta e nove (15,6%) estavam ausentes nos 4 grupos (Anexo F). O número de miRNAs detectados nas amostras dos 4 grupos foi semelhante.

Maior expressão foi observada em 13, 4 e 33 miRNAs dos grupos AcP, DM1A recente e DM1A 2-5 respectivamente e menor em 11, 7 e 31 miRNAs dos mesmos grupos. Destes, 4 miRNAs foram diferencialmente expressos nos grupos AcP, DM1A recente e DM1A 2-5 em relação ao grupo controle. Os miRNAs: miR-16, miR-195 e miR-454, estavam diminuídos nestes 3 grupos e o miR-200a, estava aumentado nos grupos AcP e DM1A recente e diminuído nos pacientes com maior duração do diabetes (DM1A 2-5), (Figura 10). Outros 8 miRNAs apresentaram expressão diferente da do grupo controle em dois dos grupos avaliados, e tendência semelhante no terceiro grupo, sendo 4 deles elevados (miR-193a-5p, miR-323-3p, miR-423-5p e miR-92a) e 4 diminuídos (miR-19a, miR-191, miR-376a, miR-590-5p). Ou neutralidade no terceiro grupo (miRNAs miR-100, miR-15b, miR-181a, miR-483-5p). Resposta antagônica foi observada para o miR-25 e miR-485-3p, diminuídos no grupo AcP e aumentados no DM1A 2- 5 (Figuras 11 e 12).

Figura 10. Expressão relativa dos miRNAs: miR-16, miR-195, miR-200a, miR-454 nos grupos AcP(portador de autoanticorpos), DM1A (diabetes autoimune de início recente) e DM1A 2-5 (diabetes autoimune com 2-5 anos de duração)

Figura 11. Expressão relativa dos miRNAs: miR-15b, miR-92a, miR-100, miR-181a; miR-193a-5p;miR-323-3p,miR-423-5p e miR-483-5p, nos grupos AcP (portador de autoanticorpos), DM1A (diabetes autoimune de início recente) e DM1A 2-5(diabetes autoimune com 2-5 anos de duração)

Figura 12. Expressão relativa dos miRNAs: miR-19a, miR-25, miR-191, miR-376a; miR-485-3p e miR-590-5p nos grupos AcP (portador de autoanticorpos), DM1A (diabetes autoimune de início recente) e DM1A 2-5 (diabetes autoimune com 2-5 anos de duração)

A ferramenta de bioinformática *COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer)* evidenciou vias canônicas enriquecidas para cinco miRNAs: miR193a-5p, 423-5p, miR-485-3p, miR-483-5p e miR-590-5p. Os alvos compreenderam vários tecidos, incluindo o tecido pancreático, os sítios de ação da insulina (músculos e fígado) e o tecido linfóide e hematopoiético Figuras 13 e 14)

Entre os alvos destes microRNAs estão o IGF1 (*insulin-like growth factor*), a Nectina, proteínas da sinalização da insulina, rede de sinalização TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) e a rede de sinalização do receptor ErbB (Figura 15).

Figura 13. Via canônicas enriquecidas associadas a 5 microRNAs: miR-193a5p; miR-423-5p; miR-485-3p; miR-483-5p e miR-590-5p

Figura 14. Tecidos Vias canônicas enriquecidas associadas a 5 microRNAs::miR-193a5p; miR-423-5p; miR-485-3p;miR-483-5p e miR-590-5p

Figura 15. Sítios de expressão para 5 microRNAs - analisados pelo COSMIC
microRNAs:miR-193a5p; miR-423-5p; miR-485-3p;miR-483-5p e miR-590-5p

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Biomarcadores capazes de predizer o grau de perda da função das células beta serão de imenso valor clínico para a otimização das terapias preventivas ou que possam retardar o processo destrutivo e prolongar a produção endógena de insulina.

Nosso estudo, avaliando diferentes estágios da manifestação imunológica e da agressão celular evidenciou mudanças no padrão de expressão dos microRNAs circulantes na progressão do DM1A. Vários destes miRNAs estão envolvidos em regulação da apoptose, de vias inflamatórias e vias reguladoras das células beta⁷⁵.

Inicialmente, no projeto piloto, evidenciamos e validamos os resultados da associação do miR-101-3p com o DM1A.

Os níveis séricos de miR-101-3p estavam elevados nos pacientes com DM1A de início recente em comparação com indivíduos com autoanticorpos pancreáticos positivos sem diabetes e controle saudáveis. Não houve diferença entre os grupos AcP e controle. No entanto, o grupo AcP era muito heterogêneo, contemplando indivíduos com ampla variação no número e títulos de autoanticorpos. Consideramos, então, apenas aqueles portadores de dois ou mais autoanticorpos, situação esta que confere risco aumentado de progressão para o diabetes¹². Nestes, os valores de miR-101-3p foram semelhantes aos de DM1A de início recente e, em ambos, significativamente maiores que os do grupo controle. Estes dados evidenciam que os níveis de

miR-101 já estavam aumentados no grupo com alto risco para desenvolver DM1A. Inclusive, nove destes indivíduos desenvolveram DM1A no seguimento, sugerindo que o miR-101 possa ser um marcador de atividade da doença / dano das células β naqueles indivíduos com níveis ainda normais de glicose.

A falta de correlação entre os níveis circulantes de miR-101-3p e HbA1c ou glicose no DM1A contrasta com os achados no diabetes tipo 2¹⁸³ e também com a observação de que a exposição *in vitro*, a altas concentrações de glicose, induz a expressão de miR-101-3p em células endoteliais¹⁸⁴.

Embora estes dados sugiram que o aumento da glicose possa ser um dos estímulos para a expressão do miR-101, nossos resultados mostraram que os níveis séricos elevados de miR-101 em DM1A ou indivíduos com múltiplos autoanticorpos eram independentes do controle metabólico. Níveis normais de Hb1Ac e glicose em indivíduos que expressam 2 ou mais autoanticorpos indicam que o aumento de miR-101 precede a progressão para DM1A.

Não foram encontradas diferenças significativas para o miR-204 entre os grupos analisados, e não houve correlação entre os níveis de miR-204 com os parâmetros metabólicos.

Embora estudos de perfil de microRNAs circulantes tenham sido realizados anteriormente^{57,185}, nosso estudo foi o primeiro a encontrar níveis aumentados de miR-101 no soro de pacientes com DM1A. Esta possível discrepância pode ter sido causada pelo número reduzido de pacientes nos estudos anteriores, idade dos pacientes, duração do diabetes ou mesmo a

diferente etnia das casuísticas. Níveis elevados de miR-101-3p foram encontrados nas células *naive* T CD4⁺¹⁸⁶ e em linfomononucleares de adultos com DM1A de longa duração¹⁸⁷. Houve uma correlação negativa de miR-101 com a idade ($r = -0.474$; $p = 0,001$), e positiva com níveis de miR-204 ($r = 0,490$; $p = 0,0001$) entre os controles saudáveis, que foram perdidas no grupo DM1A. A relação com a idade sugere que os níveis de miR-101 possam ser hipoteticamente associados à maior susceptibilidade do pâncreas à injúria ou à maior rotatividade e remodelamento das células β do jovem¹⁸⁸.

O miR-101 é codificado por dois genes, miR101-1 e miR101-2, localizados nos cromossomos 1 e 9, respectivamente, e sua transcrição pode ser controlada pelos fatores de transcrição NF-kB (*nuclear fator kappa B*), STAT1 (*signal transducers and activators of transcription*), STAT4 e STAT5a, que podem se ligar aos seus elementos promotores¹⁸⁹.

Juntamente com a regulação positiva de miR-101 determinada pela IL-1 β nas células beta¹⁹⁰, a identificação de fatores de transcrição associados a citocinas como NF-kB, STATs e a cascata de MAP-kinase-ERK 1/2 (*Mitogen Activated Protein Kinases/ [extracellular signal-regulated kinases 1 /2](#)*) evidenciam o papel das citocinas inflamatórias no aumento dos níveis de miR-101¹⁸⁹.

A origem do miR-101 circulante, aumentado nos pacientes DM1A e indivíduos com 2 ou mais autoanticorpos não está, ainda, elucidada. Níveis elevados durante o desenvolvimento do DM1A (Figura 7) poderiam sugerir sua liberação pelas células lesadas ou em processo de morte celular. Sabe-se que a citocina IL-1 β aumenta diretamente a expressão de miR-101 em

células β ¹⁹⁰. No entanto, a massa de células β no início do DM1A já está significativamente reduzida.

Embora o miR-101 seja predominantemente expresso no pâncreas¹⁸³, também é expresso de forma ubíqua em vários outros tecidos, incluindo linfomononucleares periféricos¹⁸⁷, macrófagos¹⁹¹ e células T *naïves*¹⁸⁶ de pacientes DM1A, o que também pode ter contribuído para nossos achados ou ser a principal origem do miR-101 circulante.

O miR-101 tem alvos diretos em células β como o fator de transcrição *Onecut2*, que controla a secreção de insulina através da granufilina, um inibidor da sua exocitose. Assim, na presença de miR-101, os níveis reduzidos de *Onecut2* favoreceriam a secreção inadequada da insulina¹⁹⁰.

É também possível que o miR-101 prejudique as células β através de vias adicionais. A ferramenta Target Filter do software IPA © evidenciou os alvos do miR-101 e revelou várias vias canônicas que estão enriquecidas no diabetes. Entre elas, a via do fator de crescimento de hepatócitos (HGF), controlada negativamente pelo miR-101. Este fator de crescimento, que é um reparador de tecidos¹⁹², e seu receptor trans-membrana tirosina quinase c-Met são alvos diretos do miR-101 em células de câncer de bexiga¹⁹³. A ablação c-Met leva à secreção deficiente de insulina pelas células β do camundongo¹⁹⁴, enquanto a super-expressão de HGF aumenta a replicação, massa e função desta células¹⁹⁵ e melhora o enxerto de ilhotas transplantadas¹⁹⁶. O tratamento das células com HGF aumentou a fosforilação das proteínas IRS-2 (*insulin receptor substrate 2*), AKT (*protein kinase B*) e ERK, que têm efeitos proliferativos e anti-apoptóticos, resultando em aumento

da massa de células β e da secreção de insulina¹⁹⁷. Mellado-Gil et al.¹⁹⁸ também verificaram que as ilhotas pancreáticas de camundongos, expostos *in vitro* a múltiplas doses baixas de STZ (estreptozotocina), tinham níveis de HGF e c-Met mais elevados, conferindo efeito protetor contra agentes diabetogênicos. A sinalização de HGF/ c-Met poderia atenuar a morte das células β induzida por citocinas (com ativação da via NF-kB e produção de óxido nítrico), exercendo efeitos protetores no ambiente inflamatório adverso ao redor das células β no DM1A¹⁹⁸. Como os ratos *knockout* para c-Met têm células β normais no pâncreas, mas, quando expostos a insultos (doses múltiplas e baixas de STZ), tornam-se mais susceptíveis ao diabetes, hipotetizamos que fatores genéticos ou ambientais que interfiram na via de sinalização HGF, incluindo o miR-101, podem predispor ao DM1A. Embora apenas um perfil alterado de HGF / C-Met possa não ocasionar diabetes, este pode ser um fator de risco, aumentando a susceptibilidade sob condições de estresse (dieta, infecção, etc.).

Vias adicionais que podem ser patogenticamente relevantes no DM1A incluem a via de sinalização do receptor Ephrin (**erythropoietin-producing human hepatocellular receptors**), também enriquecida entre os genes alvos do miR-101. Ephrins (Eph) e receptores de Ephrin são expressos nas células β e estão envolvidos na detecção de glicose e produção de insulina. Sob baixos índices de glicose, Eph são fosforilados e suprimem a secreção de insulina, enquanto em altas condições de glicose, Ephs são desfosforilados, promovendo a secreção de insulina¹⁹⁹.

A via STAT3 também está envolvida na sobrevivência das células β . Expressão elevada do miR-101 em células β reduz os níveis de STAT3 e da proteína anti-apoptótica Bcl2 dependente de STAT3¹⁸⁶. A sinalização STAT3 nas células β diminui a atividade da sintase de óxido nítrico induzida (NOS2) e a produção de espécies reativas de oxigênio, altamente tóxicas. A expressão de NOS2 é, por sua vez, aumentada por STAT1 e sinalização NF- κ B, ambas induzidas por citocinas inflamatórias.

Além dos alvos nas células β , o miR-101 também pode favorecer a inflamação associada ao DM1A, atuando nas células do sistema imunológico. O miR-101 é regulado positivamente em macrófagos por ligantes do receptor *Toll-like* (TLR), como os lipopolissacarídeos (LPS), ou agir diretamente na MKP-1 (MAP quinase fosfatase 1), liberando a cascata MAPK e induzindo a produção de citocinas inflamatórias¹⁹¹.

Nas células T, a expressão de miR-101 direciona a diferenciação para o fenótipo Th1 (produtor de IFN- γ), tendo como alvo a histona metiltransferase EZH2²⁰⁰⁻²⁰¹. Além disso, o miR-101 visa o gene c-Rel em células T CD4⁺, levando à menor expressão e liberação de IL-2²⁰². A produção deficiente de IL-2 foi associada à redução da função de células T reguladoras e à perda da tolerância imune observada em DM1A. Ensaios clínicos em curso estão testando o tratamento do DM1A com baixa dose de IL-2²⁰³.

Finalmente, a expressão do miR-101 também é regulada positivamente em outras doenças autoimunes, como lúpus eritematoso²⁰⁴, esclerose múltipla²⁰⁵ e rejeição de transplante²⁰⁶, à semelhança do que observamos no DM1A

Juntamente com dados da literatura, nossa análise destas vias reguladoras sugere que o aumento da expressão de miR-101 posa desempenhar múltiplos papéis na patogênese do DM1A, atuando, portanto, nas células imunes e no aumento do seu potencial inflamatório, bem como nas próprias células β , prejudicando a secreção de insulina, a sensibilidade à glicose e aumentando a susceptibilidade das células β à apoptose induzida por citocinas inflamatórias, interrompendo a sinalização HGF/ c-Met e STAT3. Assim, pode-se formular a hipótese de que a exposição sistêmica ao miR-101, como a observada em pacientes com DM1A de início recente e indivíduos com múltiplos autoanticorpos, poderia alimentar a progressão da doença.

Em continuidade à investigação da contribuição dos miRNAs na patogênese do DM1A, analisamos o perfil de 377 miRNAs séricos. Destes, avaliamos apenas os 135 miRNAs que estavam expressos em 20% ou mais das amostras de cada grupo.

Cinquenta e nove miRNAs (15,6%) estavam ausentes nos 4 grupos. O número de miRNAs detectados nas amostras dos 4 grupos foi semelhante, variando o grau de expressão.

Maior expressão foi observada em 13, 4 e 33 miRNAs dos grupos AcP, DM1A recente e DM1A 2-5 respectivamente e menor em 11, 7 e 31 miRNAs destes grupos.

O grupo AcP já evidenciou diferenças importantes em relação ao controle, sugerindo a possível intermediação de fatores inflamatórios e imunológicos nestes resultados, considerando que este grupo não apresentava os importantes distúrbios metabólicos presentes no diabetes. O

grupo DM2-5 apresentou o maior número de miRNAs com expressão diferente da do grupo controle, possivelmente dependente de alterações metabólicas e inflamatórias relacionadas à glico-lipotoxicidade.

Parte das diferenças na expressão dos miRNAs observadas no grupo AcP se repetiram nos dois grupos com diabetes em relação aos controles, fortalecendo a relevância destes miRNAs no processo.

Verificamos quatro miRNAs (miR-16, miR-195, miR-200a e miR-454) cujo comportamento, nos 3 grupos de estudo, diferiu daquele do grupo controle. O fato destas divergências estarem presentes em estágios gradativos da manifestação imunológica e da agressão celular aponta para o envolvimento destes miRNAs na fisiopatogenia do DM1A.

Os 03 miRNAs com níveis diminuídos nos 3 grupos em relação aos controles saudáveis, pareados para idade, sexo e etnia, estão associados a vias inflamatórias, vias reguladoras das células beta e mecanismos de apoptose

O miR-16 exerce importante efeito inflamatório, direcionando a polarização de macrófagos M2 para M1 e ativando células T CD4⁺ ²⁰⁷, Mecanicamente, o miR-16 regula, de forma significativa, a expressão de PD-L1 (***Programmed death-ligand 1***), um supressor imune crítico, que controla a interação e a ativação das células T.

Em paralelo, o miR-16 está presente nas células β ²⁰⁸ e regula negativamente, a proteína Ptch1 (***Protein patched homolog 1***)²⁰⁹, e a Ngn3(neurogenin3), envolvidas no desenvolvimento pancreático e diferenciação das ilhotas respectivamente, reduzindo o número de células

endócrinas e a função das células β ²⁰⁸. O miR-16, juntamente com o miR-195 (também reduzido nos 3 grupos de estudo) e o miR-15b (elevado nos grupos DM1A e DM2-5) foram relacionados com controle de proliferação e diferenciação das células beta²⁰⁸. A inibição destes miR's durante a regeneração do tecido pancreático de camundongos resultou em aumento de Ngn3 e de sua sinalização (Nkx2.2 e NeuroD1). Desta forma, redução da expressão do miR-16 poderia ser vantajosa para a regeneração das células beta. Menor expressão foi observada também no DM1A de longa duração²⁰⁹ e em situações de hiperglicemia²¹⁰ e de resistência à ação da insulina²¹¹ corroborando nosso achado nos grupos com diabetes e também no grupo AcP, Neste, a resistência à insulina decorrente da agressão autoimune e liberação de citocinas inflamatórias poderia ter diminuído os níveis de miR-16, já na fase pré-clínica da doença,

Em contraposição, o miR-195 exerce efeito anti-inflamatório (inibe o perfil pró-inflamatório de macrófagos e produção de IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa)²¹² e supressor de tumores diminuindo a expressão de múltiplos efetores na via de sinalização NF- κ B²¹³. No entanto, reduz a sensibilidade à insulina ao suprimir a expressão de receptor de insulina no fígado, impedindo a sua sinalização e a síntese de glicogênio²¹⁴. À semelhança dos nossos dados, também está diminuído no diabetes tipo2²¹⁵.

Em relação ao miR-454, Cox et al.²¹⁶ também verificaram menor expressão na esclerose múltipla, particularmente na forma progressiva em relação à aquela com períodos de remissão²¹⁷, mas seu papel no sistema

imunológico ainda é impreciso. Está associado à resistência à ação da insulina, com potenciais alvos em vias metabólicas²¹⁸.

O miR-200a apresentou respostas antagônicas, com grande diferencial entre os grupos. Sua associação com a apoptose celular foi evidenciada previamente²¹⁹⁻²²⁰. A proteína Txnip (**Thioredoxin-interacting protein**) tem função pro-apoptótica e diabetogênica e impede a função das células beta via indução de miR-200a²²⁰⁻²²¹. Altamente expresso nos grupos AcP e DM1A recente, o miR-200a possivelmente está implicado na lesão e morte das células beta e progressão para diabetes. Sua redução no grupo com diabetes de maior duração (DM1A 2-5) poderiam advir da escassez destas células neste grupo ou aos efeitos da hiperglicemia. O miR-200a está diminuído em situações de hiperglicemia²²² e em pacientes com DM2²²³. A associação de miR-200a com a autoimunidade e lesão tecidual foi evidenciada também em modelos animais de lúpus eritematoso sistêmico²²⁴, na severidade da psoríase²²⁵ e na progressão da esclerose múltipla²²⁶.

Neste contexto, as expressões diminuídas do miRNA-16, miRNA 195 e miR-454, e aumentada do miR-200a, poderão estar associadas com o ciclo de lesão-regeneração das células beta, inflamação, e distúrbios metabólicos, contemplando a resistência à ação da insulina e, mais tardiamente, a elevação dos níveis glicêmicos

A ferramenta de bioinformática *COSMIC* evidenciou vias canônicas enriquecidas para cinco miRNAs: miR193a-5p, 423-5p, miR-485-3p, miR-483-5p e miR-590-5p. Os alvos compreenderam vários tecidos, incluindo o

tecido pancreático, os sítios de ação da insulina (músculos e fígado) e o tecido linfóide e hematopoiético.

Tais miRNAs, poderiam exercer efeitos deletérios atuando em alvos como IGF1 (insulin-like growth fator), e proteínas da sinalização da insulina, e a rede de sinalização TRAIL, predispondo ao diabetes. Também interferem com Nectina, molécula de adesão com efeitos associados ao gene LMO7 (LIM domain only 7), cr 13q22, cujo polimorfismo (rs539514) predispõe ao diabetes autoimune²²⁷ e com a rede de sinalização do receptor ErbB, que regula proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Variante na região intrônica do gene ERBB3 (rs2292239) confere susceptibilidade ao DM1A, inclusive na nossa população²²⁸.

TRAIL (**TNF-related apoptosis-inducing ligand**) é uma citocina produzida e secretada por vários tecidos, que causa apoptose de tumores e parece ter importante papel no diabetes. A deficiência de TRAIL agrava o diabetes. Em animais submetidos a dieta rica em gordura, TRAIL reduziu o peso corpóreo, a adiposidade, os níveis de ácidos graxos livres e a inflamação. Melhorou a tolerância à glicose e o conteúdo hepático de gordura²²⁹. Esta melhora estava associada ao aumento no fígado de PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) e (PPAR γ) co-ativador-1 α (PGC-1 α) expression, envolvidos na sensibilização à insulina e biogênese mitocondrial indicando efeito hepático protetor.

O envolvimento destes miRNAs com a autoimunidade foi observado para o miR-423-5p que ativa a via NF- κ B e libera citocinas inflamatórias,

estando implicado na patogênese da nefrite lúpica via redução de TNIP2²³⁰. Está diminuído no DM2²³¹.

O miR-590, é altamente expresso em células Th17 circulantes de pacientes com esclerose múltipla e correlacionado positivamente com a severidade da doença. Facilita a diferenciação e patogenicidade das células Th17. O miR-590 tem como alvo Tob1, (Transducer of ERBB2, 1) supressor da diferenciação desta via, diminuindo sua expressão em linfomononucleares destes pacientes com esclerose múltipla²³². Também reduz a expressão de TRAIL em linfócitos T de pacientes com DM1A, favorecendo sua proliferação²³³.

Desta forma, níveis elevados do miR193a-5p, miR-423-5p, miR-485-3p e miR-483-5p, com envolvimento nas vias de sinalização da insulina e inflamação poderiam aumentar a susceptibilidade ao diabetes, enquanto a menor expressão de miR-590 seria protetora da inflamação mediada por linfócitos T.

Vários outros microRNAs tiveram expressão aumentada nos grupos de estudo.

O miR-15b está regulado positivamente em ilhotas de animais submetidos à desnutrição intrauterina. Inibe a proliferação de células beta pancreáticas via ciclina D1 e ciclina D2, reguladoras do ciclo celular²³⁴ e contribui para a supressão da secreção de insulina, mediada por altas concentrações de glicose, e nos processos patológicos do diabetes²³⁵.

Em paralelo, observamos expressão também aumentada do miR-100 e 181a, que regulam vários RNA mensageiros de vias do sistema imunológico

e metabólicas como MAPK, Jak-STAT, NF-KB, PI3K-Akt, apoptose, TNF, TLRs, insulina e sinalização do receptor de linfócito T²³⁶. O miR-181a agrava a resistência à insulina, sendo preditor de DM2²³⁷.

Contrariamente aos nossos dados, há relatos de menor expressão do miR-100 em portadores de DM1A^{185,236}, e do miR-15b em células B no lúpus²³⁸.

Outros três microRNAs, com maior expressão nos grupos de estudo em relação aos controles, já foram relacionados a outras doenças autoimunes, a saber: miR-92a-3p e miR-323-3p, aumentados no lúpus²³⁹ e na artrite reumatoide²⁴⁰ respectivamente, sendo considerados marcadores das doenças e o miR-25a, relacionado com DM1a⁵⁷. Estes dados evidenciam a relevância destes microRNAs na autoimunidade

Cerca de outros 3 miR, que interferem com a função insulínica e autoimunidade estão diminuídos. Células T reguladoras de pacientes com DM1A também têm menor expressão de miR-191²⁴¹. A redução dos níveis de miR-375, que interfere com desenvolvimento pancreático²⁴² e do miR-19 a, que aumenta a proliferação e secreção de insulina e inibe apoptose das células β ²⁴³ via inibição de SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*) também parecem corroborar com o desenvolvimento do diabetes.

No nosso estudo observamos discrepâncias, já esperadas, em relação aos dados de literatura, possivelmente relacionadas às diferenças na casuística, idade dos participantes, gênero, duração do diabetes e graus de intolerância à glicose, como evidenciado pelos nossos próprios resultados nas fases de autoimunidade, diabetes de início recente ou de longa duração.

Interferências frente ao processamento inadequado das amostras, origem das amostras (tecido, plasma, soro ou células linfomononucleares|) e presença de hemólise devem também ser consideradas.

Nosso estudo tem limitações, tais como: casuística relativamente pequena e conclusões baseadas em alvos de genes preditos por bioinformática, mas não validados experimentalmente ou não validados em células β pancreáticas. No entanto, trouxe contribuições sobre a expressão de ampla gama de microRNAs no diabetes autoimune

Pouco se sabe sobre a origem dos miRNAs circulantes. Poderiam mediar comunicação entre células ou serem apenas produtos de células mortas? O mecanismo de sua liberação é pouco conhecido, assim como suas vias de atuação e funções. No entanto, sua estabilidade e conservação evolucionária e sua fácil detecção por PCR real time os torna atrativos na busca de fatores determinantes para o desencadeamento da agressão autoimune e progressão para o diabetes manifesto.

Nossos resultados sugerem que os microRNAs circulantes podem ter papel atuante na patogênese do DM1A, seja interferindo na secreção e ação da insulina, ou na função das células do sistema imune e na inflamação, culminando com a susceptibilidade ou proteção para o diabetes. Mecanismos de antagonismo das vias inflamatórias ou incremento de vias associadas com proliferação e manutenção das células beta e com redução da inflamação mediadas por microRNAs poderão ter potencial terapêutico.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

A avaliação da expressão de microRNAs séricos em indivíduos saudáveis portadores de autoanticorpos pancreáticos (AcP), pacientes com diabetes autoimune de diagnóstico recente (DM1A) e pacientes com diabetes de duração de 2 a 5 anos (DM1A 2-5) em relação aos controles saudáveis evidenciou a expressão de microRNAs relacionados com fatores inflamatórios e de lesão celular diferiu dos controles em dois ou três grupos de estudo, sugerindo sua participação na patogênese do diabetes autoimune.

Diferenças na expressão de microRNAs no grupo portador de autoanticorpos pancreáticos em relação aos controles sugere a intermediação de fatores inflamatórios e imunológicos associados à manifestação de autoimunidade, e independentes da hiperglicemia.

A expressão diferencial dos microRNAs foi maior nos pacientes com maior duração do diabetes em relação aos controles, possivelmente dependente de alterações metabólicas e inflamatórias relacionadas à glicolipotoxicidade.

A determinação dos microRNAs séricos pode ser útil nas avaliações de progressão do diabetes e de intervenções terapêuticas.

ANEXOS

ANEXO A. miRNA Placa TLDA - em negrito os miR's do estudo

Assay ID	Assay Name	Assay ID	Assay Name	Assay ID	Assay Name
000377	hsa-let-7a	000437	hsa-miR-100	000482	hsa-miR-181c
000379	hsa-let-7c	002253	hsa-miR-101	002334	hsa-miR-182
002283	hsa-let-7d	000439	hsa-miR-103	002269	hsa-miR-183
002406	hsa-let-7e	002167	hsa-miR-105	000485	hsa-miR-184
000382	hsa-let-7f	002169	hsa-miR-106a	002271	hsa-miR-185
002282	hsa-let-7g	000442	hsa-miR-106b	002285	hsa-miR-186
002222	hsa-miR-1	000443	hsa-miR-107	001193	mmu-miR-187
000583	hsa-miR-9	002245	hsa-miR-122	002106	hsa-miR-188-3p
000387	hsa-miR-10a	001182	mmu-miR-124a	000489	hsa-miR-190
002218	hsa-miR-10b	002199	hsa-miR-125a-3p	002299	hsa-miR-191
000389	hsa-miR-15a	002198	hsa-miR-125a-5p	000491	hsa-miR-192
000390	hsa-miR-15b	000449	hsa-miR-125b	002250	hsa-miR-193a-3p
000391	hsa-miR-16	002228	hsa-miR-126	002281	hsa-miR-193a-5p
002308	hsa-miR-17	000452	hsa-miR-127	002367	hsa-miR-193b
002422	hsa-miR-18a	002229	hsa-miR-127-5p	000493	hsa-miR-194
002217	hsa-miR-18b	002216	hsa-miR-128a	000494	hsa-miR-195
000395	hsa-miR-19a	001184	mmu-miR-129-3p	002215	hsa-miR-196b
000396	hsa-miR-19b	000590	hsa-miR-129	000497	hsa-miR-197
000580	hsa-miR-20a	000454	hsa-miR-130a	002273	hsa-miR-198
001014	hsa-miR-20b	000456	hsa-miR-130b	000498	hsa-miR-199a
000397	hsa-miR-21	000457	hsa-miR-132	002304	hsa-miR-199a-3p
000398	hsa-miR-22	002246	hsa-miR-133a	000500	hsa-miR-199b
000399	hsa-miR-23a	002247	hsa-miR-133b	000502	hsa-miR-200a
000400	hsa-miR-23b	001186	mmu-miR-134	002251	hsa-miR-200b
000402	hsa-miR-24	000460	hsa-miR-135a	002300	hsa-miR-200c
000403	hsa-miR-25	002261	hsa-miR-135b	002363	hsa-miR-202
000405	hsa-miR-26a	000592	hsa-miR-136	000507	hsa-miR-203
000407	hsa-miR-26b	001129	mmu-miR-137	000508	hsa-miR-204
000408	hsa-miR-27a	002284	hsa-miR-138	000509	hsa-miR-205
000409	hsa-miR-27b	002313	hsa-miR-139-3p	002290	hsa-miR-208b
002446	hsa-miR-28-3p	002289	hsa-miR-139-5p	000512	hsa-miR-210
000411	hsa-miR-28	002234	hsa-miR-140-3p	002306	hsa-miR-214
002112	hsa-miR-29a	001187	mmu-miR-140	000518	hsa-miR-215
000413	hsa-miR-29b	000463	hsa-miR-141	002220	hsa-miR-216a
000587	hsa-miR-29c	000464	hsa-miR-142-3p	002326	hsa-miR-216b
000602	hsa-miR-30b	002248	hsa-miR-142-5p	002337	hsa-miR-217
000419	hsa-miR-30c	002249	hsa-miR-143	000521	hsa-miR-218
002279	hsa-miR-31	002278	hsa-miR-145	000522	hsa-miR-219
002109	hsa-miR-32	000468	hsa-miR-146a	000524	hsa-miR-221
002085	hsa-miR-33b	002361	hsa-miR-146b-3p	002276	hsa-miR-222
000426	hsa-miR-34a	001097	hsa-miR-146b	002295	hsa-miR-223
000428	hsa-miR-34c	002262	hsa-miR-147b	002099	hsa-miR-224
000431	hsa-miR-92a	000470	hsa-miR-148a	002101	hsa-miR-296-3p
001090	mmu-miR-93	000471	hsa-miR-148b	000527	hsa-miR-296
000433	hsa-miR-95	002255	hsa-miR-149	001015	hsa-miR-299-3p
000186	mmu-miR-96	000473	hsa-miR-150	000600	hsa-miR-299-5p
000577	hsa-miR-98	000475	hsa-miR-152	000528	hsa-miR-301
000435	hsa-miR-99a	001191	mmu-miR-153	002392	hsa-miR-301b
000436	hsa-miR-99b	000477	hsa-miR-154	000529	hsa-miR-302a
		000480	hsa-miR-181a	000531	hsa-miR-302b

Continua

Continuação Tabela Anexo A

Assay ID	Assay Name	Assay ID	Assay Name	Assay ID	Assay Name
000533	hsa-miR-302c	002340	hsa-miR-423-5p	001145	hsa-miR-512-5p
002277	hsa-miR-320	000604	hsa-miR-424	002090	hsa-miR-513-5p
002227	hsa-miR-323-3p	001516	hsa-miR-425-5p	002369	hsa-miR-515-3p
002161	hsa-miR-324-3p	001024	hsa-miR-429	001112	hsa-miR-515-5p
000539	hsa-miR-324-5p	001979	hsa-miR-431	002416	hsa-miR-516a-5p
000542	hsa-miR-326	001028	hsa-miR-433	001150	hsa-miR-516b
000543	hsa-miR-328	001030	hsa-miR-449	002402	hsa-miR-517a
001101	hsa-miR-329	001608	hsa-miR-449b	001153	hsa-miR-517c
000544	hsa-miR-330	002303	hsa-miR-450a	002397	hsa-miR-518a-3p
002230	hsa-miR-330-5p	002208	hsa-miR-450b-3p	002396	hsa-miR-518a-5p
000545	hsa-miR-331	002207	hsa-miR-450b-5p	001156	hsa-miR-518b
002233	hsa-miR-331-5p	001141	mmu-miR-451	002401	hsa-miR-518c
000546	hsa-miR-335	002329	hsa-miR-452	001159	hsa-miR-518d
002156	hsa-miR-337-5p	002318	hsa-miR-453	002389	hsa-miR-518d-5p
002252	hsa-miR-338-3p	002323	hsa-miR-454	002395	hsa-miR-518e
002184	hsa-miR-339-3p	002244	hsa-miR-455-3p	002388	hsa-miR-518f
002257	hsa-miR-339-5p	001280	hsa-miR-455	002415	hsa-miR-519a
002258	hsa-miR-340	002338	hsa-miR-483-5p	002403	hsa-miR-519d
002623	hsa-miR-155	001821	hsa-miR-484	002370	hsa-miR-519e
002619	hsa-let-7b	001277	hsa-miR-485-3p	001167	hsa-miR-520a
002260	hsa-miR-342-3p	001036	hsa-miR-485-5p	001168	hsa-miR-520a#
002147	hsa-miR-342-5p	002093	hsa-miR-486-3p	002393	hsa-miR-520d-5p
002186	hsa-miR-345	001278	hsa-miR-486	001121	hsa-miR-520g
000554	hsa-miR-361	001279	hsa-miR-487a	001122	hsa-miR-521
002117	hsa-miR-362-3p	001285	hsa-miR-487b	002413	hsa-miR-522
001273	hsa-miR-362	002357	hsa-miR-488	002386	hsa-miR-523
001271	hsa-miR-363	002358	hsa-miR-489	001982	hsa-miR-524-5p
001020	hsa-miR-365	001037	hsa-miR-490	002385	hsa-miR-525-3p
000555	hsa-miR-367	002360	hsa-miR-491-3p	001174	hsa-miR-525
000557	hsa-miR-369-3p	001630	mmu-miR-491	002382	hsa-miR-526b
001021	hsa-miR-369-5p	002364	hsa-miR-493	002355	hsa-miR-532-3p
002275	hsa-miR-370	002365	hsa-miR-494	001518	hsa-miR-532
002124	hsa-miR-371-3p	001663	mmu-miR-495	001286	hsa-miR-539
000560	hsa-miR-372	001953	mmu-miR-496	002201	hsa-miR-541
000561	hsa-miR-373	002427	hsa-miR-499-3p	001284	hsa-miR-542-3p
000563	hsa-miR-374	001352	mmu-miR-499	002240	hsa-miR-542-5p
001319	mmu-miR-374-5p	002428	hsa-miR-500	002265	hsa-miR-544
000564	hsa-miR-375	002435	hsa-miR-501-3p	002267	hsa-miR-545
000565	hsa-miR-376a	001047	hsa-miR-501	001538	hsa-miR-548a
001102	hsa-miR-376b	002083	hsa-miR-502-3p	002412	hsa-miR-548a-5p
000566	hsa-miR-377	001109	hsa-miR-502	001541	hsa-miR-548b
001138	mmu-miR-379	001048	hsa-miR-503	002408	hsa-miR-548b-5p
000569	hsa-miR-380-3p	002084	hsa-miR-504	001590	hsa-miR-548c
000571	hsa-miR-381	002089	hsa-miR-505	002429	hsa-miR-548c-5p
000572	hsa-miR-382	001051	hsa-miR-507	001605	hsa-miR-548d
000573	hsa-miR-383	001052	hsa-miR-508	002237	hsa-miR-548d-5p
002331	hsa-miR-409-5p	002092	hsa-miR-508-5p	001535	hsa-miR-551b
001274	hsa-miR-410	002235	hsa-miR-509-5p	002345	hsa-miR-556-3p
001610	hsa-miR-411	002241	hsa-miR-510	002344	hsa-miR-556-5p
002297	hsa-miR-422a	001823	hsa-miR-512-3p	001528	hsa-miR-561

Continua

Continuação Tabela – Anexo A

Assay ID	Assay Name	Assay ID	Assay Name
002347	hsa-miR-570	002204	hsa-miR-875-3p
002349	hsa-miR-574-3p	002225	hsa-miR-876-3p
002351	hsa-miR-576-3p	002205	hsa-miR-876-5p
002350	hsa-miR-576-5p	002372	hsa-miR-885-3p
002398	hsa-miR-579	002296	hsa-miR-885-5p
002399	hsa-miR-582-3p	002194	hsa-miR-886-3p
001983	hsa-miR-582-5p	002193	hsa-miR-886-5p
002409	hsa-miR-589	002374	hsa-miR-887
001984	hsa-miR-590-5p	002212	hsa-miR-888
001551	hsa-miR-597	002202	hsa-miR-889
001988	hsa-miR-598	002209	hsa-miR-890
001960	mmu-miR-615	002191	hsa-miR-891a
002353	hsa-miR-615-5p	002210	hsa-miR-891b
002414	hsa-miR-616	002195	hsa-miR-892a
001593	hsa-miR-618	000469	hsa-miR-147
002430	hsa-miR-624	000511	hsa-miR-208
002431	hsa-miR-625	000514	hsa-miR-211
001560	hsa-miR-627	000515	hsa-miR-212
002433	hsa-miR-628-5p	002095	hsa-miR-219-1-3p
002436	hsa-miR-629	002390	hsa-miR-219-2-3p
002088	hsa-miR-636	000523	hsa-miR-220
001592	hsa-miR-642	002206	hsa-miR-220b
001604	hsa-miR-651	002211	hsa-miR-220c
002352	hsa-miR-652	002190	hsa-miR-298
002292	hsa-miR-653	000540	hsa-miR-325
002239	hsa-miR-654-3p	000553	hsa-miR-346
001611	hsa-miR-654	002122	hsa-miR-376c
001612	hsa-miR-655	000574	hsa-miR-384
001515	hsa-miR-660	001023	hsa-miR-412
002322	hsa-miR-671-3p	001029	hsa-miR-448
002327	hsa-miR-672	001039	hsa-miR-492
002021	hsa-miR-674	001050	hsa-miR-506
002341	hsa-miR-708	002155	hsa-miR-509-3-5p
002324	hsa-miR-744	001111	hsa-miR-511
001990	hsa-miR-758	001152	hsa-miR-517b
002354	hsa-miR-871	001163	hsa-miR-519c
002264	hsa-miR-872	001116	hsa-miR-520b
002356	hsa-miR-873	001119	hsa-miR-520e
002268	hsa-miR-874	001120	hsa-miR-520f

Anexo B. Características demográficas e clínicas dos indivíduos portadores de diabetes tipo 1 autoimune (DM1A) diagnóstico recente.

ID	Gen	Etnia	Idade Coleta (anos)	Duração doença (anos)	Glic (mg/dL)	HbA1C (%)	IAA nU/mL	anti-GAD U/mL	anti-ZnT8 U/mL	anti-IA2 U/mL	PepC ng/mL	HLA-DRB1	HLA-DRB1	HLA-DQB1	HLA-DQB1
1	M	B	14,38	0,08	114,00	6,88	1890,00	125,00	723,00	2987,00		301	12	201	301
3	M	B	12,98	0,60	176,00	7,44	6090,00	85,00	1137,00	2075,00	0,70	301	405	201	302
4	F	B	11,53	0,40	156,00	6,80	5826,00	115,00	1407,00	5462,00		1	405	501	302
5	M	B	14,79	0,28	52,00	8,48		14,00	117,00	492,00	1,80	301	402	201	302
7	F	B	15,18	0,11	84,00	6,24	0,00	265,00	317,00	1837,00	1,10	301	402	201	302
8	M	B	16,60	0,05	103,00	10,60		53,20	1202,00	1889,00	0,32	301	401	201	302
9	M	NB	25,56	0,30	82,00	6,16	1731,00	60,00	1180,00	2450,00	0,23	301	14	302	501
10	F	B	7,58	0,50	97,00	6,80	7330,00	25,00	196,00	887,00		402	8	302	402
11	M	B	8,00	0,17	448,00	8,08	7359,00	22,50	957,00	3000,00		301	405	201	302
12	M	B	5,48	0,33	80,00	6,88	7342,00	25,00	751,00	2337,00	0,40	301	8	201	402
13	F	B	9,72	0,23	80,00	7,92	2360,00	75,00	2601,00	4387,00	0,70	405	12	302	301
14	F	B	10,54	0,08	226,00	10,48	11614,00	165,00	521,00	550,00	0,60	401	402	302	302
15	M	B	20,96	0,29	236,00	8,80	43,00	490,50	57,00	275,00	2,00	401	12	302	301
17	F	B	11,41	0,10	126,00	7,40		1407,00	949,00	1487,00	0,27	1	301	501	201
19	F	B	10,15	0,41	82,00	10,70		1260,00	300,00	737,00	0,21	301	401	201	302
20	M	B	26,10	0,08	66,00	5,30		250,00		46,00					
21	M	B	7,15	0,50	70,00	5,76	9533,00	0,00	1000,00	244,00		401	402	301	301
22	F	NB	19,99	0,24	141,00	6,80	32100,00	422,50		16,00		9	10	202	501
23	F	B	9,99	0,23	99,00	6,32	19890,00	75,00	2919,00	2562,00		4	8	302	302
24	F	B	6,12	0,50	71,00	9,12	4310,00	200,00	498,00	712,00		301	405	201	302
25	M	B	13,08	0,00	233,00	11,84	2202,00	1525,00	1097,00	2787,00		301	405	201	302
26	F	B	11,99	0,50	289,00	9,12	2029,00	717,50	566,00	1225,00		301	401	201	302
27	M	B	20,35	0,35	113,00	7,28	665,00	32,50	0,00	12,00		406	7	402	202
28	M	B	18,20	0,12	91,00	6,20		158,00	578,00	341,00	0,65	301	301	201	201
29	M	B	27,31	0,07	246,00	8,70		250,00	712,00	143,60	1,20	1	301	501	202
30	F	B	14,84	0,51	117,00	9,30		732,00	548,00	964,00	0,60	301	405	201	301
32	F	NB	28,45	0,00	182,00	6,96	62,00	472,50	15,00	150,00		3	4	201	302
34	F	NB	8,78	0,15	261,00	7,12	59,00	222,50	1496,00	337,00	0,60	403	7	301	202
35	F	B	16,40	0,50	176,00	9,92	175,00	1430,00	0,00	3,60	1,20	1	301	501	201
36	M	B	11,81	0,29	87,00	6,40	97,00	29,00	8,40	292,00	1,08	301	307	201	201

Gen= gênero; Glic= Glicose; HbA1C= hemoglobina glicada; IAA=autoanticorpo anti insulina; GAD= autoanticorpo anti descarboxilase do ácido glutâmico 65; ZnT8=autoanticorpo anti transportador do zinco 8; IA2= Autoanticorpo anti tirosino-quinase; PepC= peptídeo C; M= masculino; F= feminino; B= branco; NB= não branco.

Anexo C. Características demográficas e clínicas dos indivíduos portadores de anticorpos pancreáticos positivos sem diabetes (AcP).

ID	Gen	Etnia	Idade coleta (anos)	Glic (%)	HbA1C (%)	anti-GAD UI/mL	ZnT8 UI/mL	anti-IA2 UI/mL	IAA nU/mL	PeP-C ng/mL	HLA-DRB1	HLA-DRB2	HLA-DQB1	HLA-DQB2
1	F		11,73	90,00	5,28	0,00	1,70	0,00	237,00					
2	M	B	8,19	88,00	5,28	32,50	972,00	275,00	343,00		301	401	201	302
3	M	B	10,02	77,00	4,08	1480,00	1000,00	62,00	24,00		301	408	201	301
4	F	B	4,72	78,00	4,72	0,00	9,20	25,00	130,00					
5	F	B	22,05	86,00	4,56	0,00	0,00	12,00	255,00		301	11	201	301
6	M	B	16,81	77,00	4,24	92,50	4,30	25,00	161,00		3	7	201	202
7	F		11,00	77,00	5,04	0,00		37,00	153,00		3	4	202	302
8	F	NB	6,17	80,00	4,00	752,50	3630,00	1200,00	180,00		403	7	301	202
9	M	B	8,58	93,00	5,44	80,00	9,00	0,00	85,00					
10	F	NB	27,89	114,00	5,70	560,00	19,00	125,00	47,00		3	4	201	302
11	F	B	11,45	78,00	4,00	2715,00	15,00	37,00	472,00		1	301	501	201
12	M	NB	6,01	88,00	5,36	282,50	3,00	0,00	38,00					
14	M	B	10,69	96,00	4,80	2165,00	692,00	587,00	273,00		3	16	201	502
15	M	B	11,80	87,00	4,64	115,00	3,00	12,00	27,00		405	405	301	302
16	M	B	13,38	91,00	4,80	47,50	4,30	12,00	40,00	2,90	3	4	201	302
17	M		18,00	79,00		62,50	5,90	0,00	0,00	2,70	301	8		
18	M	B	19,43	73,00	5,12	35,00	860,00	211,00	129,00	1,70	1	301	501	202
20	F	NB	15,66		5,40	125,00	0,00	0,00	0,00	3,80	301	307	201	201
21	F	B	11,81	85,00	5,50	64,00	5,10	12,00	54,00	3,23	701	701	202	202
22	M	B	21,24	86,00	5,30	85,00	5,10	0,00	28,00	1,10	11	14	602	503
23	M	NB	20,47	92,00	5,60	50,00	0,00	0,00	0,00	2,10	301	1	501	201
24	M	NB	9,41	89,00	5,30	12,40	0,00	180,00		1,20	301	406	201	402
25	M	NB	33,50	94,00	4,72	377,50	541,00	0,00	86,00	1,40	301	401	201	302
26	F	NB	13,96	86,00	5,12	10,00	27,30	0,00	0,00	2,40	13	15	603	602
27	M	B	10,19	83,00	4,80	37,50	4,30	262,00	0,00		301	307	201	201

Gen = gênero; Glic= Glicose; HbA1C= hemoglobina glicada; IAA= autoanticorpo anti insulina; GAD= autoanticorpo anti descarboxilase do ácido glutâmico 65; ZnT8= autoanticorpo anti transportador do zinco 8; IA2= Autoanticorpo anti tirosino-quinase; PeP-C= peptídeo C; M= masculino; F= feminino; B= branco; NB= não branco.

Anexo D. Características demográficas e clínicas dos indivíduos portadores de diabetes tipo 1 A com duração 2-5anos (DM1A 2-5).

ID	Gen	Etnia	Idade da coleta (anos)	Duração doença (anos)	GLIC (mg/dL)	HbA1C (%)	anti- GAD UI/mL	anti-Znt8 UI/mL	anti- IA2 UI/mL	PEPC ng/mL	HLA DRB1	HLA DQB1	HLA DQB1
2	M	B	10,46	4,46	288,00	7,36	607,50	244,00	145,00		301	15	602
3	F	B	17,90	5,90	246,00	7,20	0,00	33,00	0,00		405	9	303
4	M	B	8,78	3,78	197,00	6,08	5,00	170,00	737,00		301	401	302
5	M	B	8,73	3,73	210,00	7,92	1415,00	20,00	630,00		401	7	202
6	F	B	28,81	3,81	260,00	10,72	767,50	0,00	37,00		301	401	302
7	M	NB	14,80	2,80	180,00	8,56	55,00	10,00	187,00		7	8	402
8	M	B	12,10	2,10	417,00	7,92	325,00	123,00	600,00		301	14	503
9	M	NB	11,99	2,99	189,00	8,80	12,50	548,00	3500,00		401	12	301
10	M	B	19,59	3,59	129,00	7,92	12,50	0,00	3012,00		1	405	302
11	M	NB	14,89	3,89	153,00	8,16	10,00	2,00	175,00		301	405	302
12	M	B	10,81	3,89	85,00	8,64	5,00	918,00	25,00		401	402	301
13	F	B	20,23	3,23	89,00		5,00	9,00	162,00				
14	F	NB	18,40	3,40	320,00	12,88	20,00	670,00	1450,00		401	9	202
15	F	B	6,49	5,49	196,00	7,84	1212,00	33,00	9,00	0,00	301	301	201
16	M	B	15,36	2,36	327,00	13,52	227,50	800,00	1225,00		301	402	302
17	M	B	25,12	4,12	324,00	8,24	7,50	160,00	0,00	0,10	301	307	201
18	F	B	15,84	4,84	101,00	7,84	677,50	2,00	401,00		301	407	302
19	M	B	20,21	4,21	287,00	7,30	547,50	849,00	187,00	0,23	301	408	301
20	F	B	12,21	4,21	372,00	8,60	46,00	639,00	446,00		301	15	602
21	F	NB	6,48	5,48	148,00	9,20	150,00	0,00	37,00	0,10	401	9	202
23	M	NB	3,97	2,87	59,00	8,60	12,50	34,00	0,00	0,24	301	402	302
24	F	B	22,04	5,04	113,00		5243,00	492,00	662,00	0,13	301	401	302
25	F	B	12,68	2,68	136,00	7,70	1598,00	48,00	12,50	0,40	301	901	303
26	F	B	13,55	5,55	181,00	8,40	41,00	473,00	441,00	0,40	301	402	302
30	M	B	11,58	2,55	103,00	4,56	22,50		225,00		301	401	302
31	M	B	12,99	2,00		12,10	25,00	0,00	280,00		301	307	201

Gen= gênero; Glic= Glicose; HbA1C= hemoglobina glicada; IA2= autoanticorpo anti insulina; GAD= autoanticorpo anti descarboxilase do ácido glutâmico 65; Znt8= autoanticorpo anti transportador do zinco 8; IA2= Autoanticorpo anti tirosino-quinase; PepC= peptídeo C; M= masculino; F= feminino; B= branco; NB= não branco.

Anexo E. Características demográficas e clínicas dos indivíduos controles saudáveis (C).

ID	Gen	Etnia	Idade Coleta (anos)	GLIC (mg/dL)	HbA1C (%)	anti-GAD65 UI/mL	anti-Znt8 UI/mL	anti-IA2 UI/mL	IAA mU/mL	Pep C ng/mL	HLA DRB1	HLA DQB1	HLA DQB1
1	F	NB	14,85	75,00	4,48	25,00	4,00	0,00	55,00	4,00	15,00	16,00	301,00
2	M	NB	19,00	85,00	5,10	1,50	0,00	19,00	0,00	2,00	11,00	16,00	502,00
3	F	B	18,60	66,00	5,50	0,00	9,00	12,50	0,00	2,10	7,00	14,00	503,00
4	F	B	18,81	67,00	5,50	2,50	9,00	0,00	0,00	3,10	7,00	16,00	502,00
5	M	B	20,15	63,00	5,30	22,50	6,00	12,50	13,00	1,80	13,00	14,00	503,00
6	F	NB	17,84	82,00	5,40	0,00	0,00	0,00	31,00	2,00	11,00	13,00	611,00
7	F	B	18,73	78,00	5,36	0,00	8,00	0,00	10,00	4,70	8,00	15,00	602,00
8	M	B	12,16	92,00		17,50	0,00	0,00	0,00	2,14	1,00	11,00	602,00
9	M	NB	12,60	91,00	4,40	0,00	5,00	0,00	0,00	2,60	1,00	16,00	301,00
10	F	NB	14,08	83,00		10,00	7,00	0,00	25,00	2,50	8,00	15,00	602,00
12	M	NB	11,14	81,00	5,50	2,70	0,00	0,00	0,00	2,40	13,00	15,00	602,00
13	F	NB	22,50	91,00	4,40	0,00	4,00	0,00	43,00	2,18	14,00	14,00	503,00
14	F	B	18,33	84,00	5,20	0,00	6,00	0,00	2,00	3,00	1,00	8,00	402,00
15	F	B	22,17	91,00	4,56	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	7,00	14,00	302,00
16	M	B	26,72	84,00	5,28	0,00	1,00	0,00	20,00	2,50	13,00	15,00	603,00
17	M	B	24,82	74,00	4,88	0,00	1,00	25,00	0,00	2,30	13,00	14,00	503,00
18	F	B	20,35	71,00	5,40	7,50	4,00	75,00	0,00	7,40	8,00	11,00	301,00
19	F	B	19,27	77,00	4,90	0,00	1,00	0,00	2,00	3,10	7,00	15,00	602,00
20	F	NB	20,02	77,00	5,00	0,00	9,00	0,00	0,00	2,30	1,00	15,00	602,00
21	F	B	9,16	79,00	4,50	0,00	1,00	25,00	0,00	1,90	12,00	12,00	501,00
22	F	B	7,42	79,00	5,40	0,00	1,00	0,00	19,00	1,03	13,00	13,00	603,00
23	M	B	8,00	82,00	5,30	0,00	0,00	0,00	40,00	0,70	12,00	16,00	301,00
24	M	B	14,75	90,00	5,40	0,00		37,00	0,00	1,33	401,00	7,00	202,00
25	M	B	15,45	89,00	5,10	0,00	0,90	2,30			7	11	301
26	F	B	10,65	89,00	5,30	0,00	14,60	1,80			9	11	303
27	M	B	10,24	87,00	5,20	0,00	0,00	1,60			12	15	602
28	F	NB	9,62	76,00	5,10	0,70	0,00	2,10		1,60	301	7	201
29	F	B	5,13	77,00	5,10	0,10	0,00	2,10		1,70	11	13	502
30	M	B	16,83	78,00	5,50	1,50	4,30	12,50	0,00	1,70	301,00	13,00	609,00

Gen= gênero; Glic= Glicose; HbA1C= hemoglobina glicada; IAA= autoanticorpo anti insulina; GAD= autoanticorpo anti descarboxilase do ácido glutâmico 65; Znt8= autoanticorpo anti transportador do zinco 8; IA2= Autoanticorpo anti tirosino-quinase; PepC= peptídeo C; M= masculino; B= feminino; B= branco; NB= não branco

ANEXO F. microRNAs que não houve amplificação nos 4 grupos estudados

Assay ID	Assay Name	Pool	Controle (29)	DM1A recente (31)	DM1 - 2-5 (26)	AbP (25)
000398	hsa-miR-22	A	0	0	0	0
002085	hsa-miR-33b	A	0	0	0	0
001184	mmu-miR-129-3p	A	0	0	0	0
001129	mmu-miR-137	A	0	0	0	0
000477	hsa-miR-154	A	0	0	0	0
002106	hsa-miR-188-3p	A	0	0	0	0
002250	hsa-miR-193a-3p	A	0	0	0	0
002290	hsa-miR-208b	A	0	0	0	0
002220	hsa-miR-216a	A	0	0	0	0
002326	hsa-miR-216b	A	0	0	0	0
002337	hsa-miR-217	A	0	0	0	0
001101	hsa-miR-329	A	0	0	0	0
002230	hsa-miR-330-5p	A	0	0	0	0
002233	hsa-miR-331-5p	A	0	0	0	0
000557	hsa-miR-369-3p	A	0	0	0	0
001021	hsa-miR-369-5p	A	0	0	0	0
002124	hsa-miR-371-3p	A	0	0	0	0
000560	hsa-miR-372	A	0	0	0	0
001102	hsa-miR-376b	A	0	0	0	0
000566	hsa-miR-377	A	0	0	0	0
000569	hsa-miR-380-3p	A	0	0	0	0
001608	hsa-miR-449b	A	0	0	0	0
002303	hsa-miR-450a	A	0	0	0	0
002208	hsa-miR-450b-3p	A	0	0	0	0
002318	hsa-miR-453	A	0	0	0	0
001051	hsa-miR-507	A	0	0	0	0
002092	hsa-miR-508-5p	A	0	0	0	0
002241	hsa-miR-510	A	0	0	0	0
001145	hsa-miR-512-5p	A	0	0	0	0
002090	hsa-miR-513-5p	A	0	0	0	0
002416	hsa-miR-516a-5p	A	0	0	0	0
002401	hsa-miR-518c	A	0	0	0	0
002389	hsa-miR-518d-5p	A	0	0	0	0
002395	hsa-miR-518e	A	0	0	0	0
001168	hsa-miR-520a#	A	0	0	0	0
001982	hsa-miR-524-5p	A	0	0	0	0
002385	hsa-miR-525-3p	A	0	0	0	0
002412	hsa-miR-548a-5p	A	0	0	0	0
001541	hsa-miR-548b	A	0	0	0	0
002345	hsa-miR-556-3p	A	0	0	0	0
002344	hsa-miR-556-5p	A	0	0	0	0
002350	hsa-miR-576-5p	A	0	0	0	0
001983	hsa-miR-582-5p	A	0	0	0	0
002430	hsa-miR-624	A	0	0	0	0

Continua

Continuação Tabela Anexo F

002292	hsa-miR-653	A	0	0	0	0
002239	hsa-miR-654-3p	A	0	0	0	0
002205	hsa-miR-876-5p	A	0	0	0	0
002195	hsa-miR-892a	A	0	0	0	0
002095	hsa-miR-219-1-3p	A	0	0	0	0
002390	hsa-miR-219-2-3p	A	0	0	0	0
000523	hsa-miR-220	A	0	0	0	0
002211	hsa-miR-220c	A	0	0	0	0
000540	hsa-miR-325	A	0	0	0	0
000574	hsa-miR-384	A	0	0	0	0
001029	hsa-miR-448	A	0	0	0	0
001039	hsa-miR-492	A	0	0	0	0
002155	hsa-miR-509-3-5p	A	0	0	0	0
001163	hsa-miR-519c	A	0	0	0	0
001119	hsa-miR-520e	A	0	0	0	0

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005; 365: 1333–1346.
2. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 2011; 91:79–118.
3. IDF (2014) http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_EN.pdf
4. Noble JA, Valdes AM. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep.*2011; 11:533-42.
5. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30 (Suppl 1):S42-7
6. Rossi MER, Mory D, Davini E. Marcadores Genéticos e Auto-Imunes do Diabetes Melito Tipo 1: da Teoria para a Prática – Arquivos Bras Endocrinol Metab 2008; 52:166-80)
7. Liu E, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes *mellitus*-associated autoimmunity. *Endocrinol.Metab Clin North Am.* 2002; 31:391-410.
8. Todd JA .Etiology of type 1 diabetes. *Immunity.* 2010; 32:457–467.
9. Morran MP, Vonberg A, Khadra A, Pietropaolo M Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus. *Mol Asp Med.* 2015; 42:42–60.
10. Jahromi MM, Eisenbarth GS. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64:865-72.
11. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, La- Porte R, Jaakko T. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide.*Diabetes Care.* 2000; 23:1516-26.
12. Eisenbarth, G. S. & Lafferty, K. Type 1 diabetes: Cellular, Molecular and Clinical Immunology. Avaliable from [http://www.uchsc.edu/misc/diabetes/ books.html](http://www.uchsc.edu/misc/diabetes/books.html). Cited 2018 dec 26.

13. Pihoker c, gilliam IK, Hampe cs, lernmark A. Autoantibodies in diabetes. diabetes. 2005;54 suppl 2:s52-61.
14. Kantárová d, Buc M. genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. Physiol res. 2007;56(3):255-66.
15. Mattana TCC, Santos AS, Fukui RT, Mainardi-Novo DTO, Costa VS, Santos RF, Mاتيoli SR and Silva MER. CD226 rs763361 Is Associated with the Susceptibility to Type 1 Diabetes and Greater Frequency of GAD65 Autoantibody in a Brazilian Cohort. Mediators of Inflammation.2014; volume 2014 Article ID 694948, 7 pages.
16. Schneider DA, von Herrath MG. Viruses and type 1 diabetes: a dynamic labile equilibrium. Diabetes Manag (Lond).2013; 3:217– 23.
17. Jaidane H, Sauter P, Sane F, Goffard A, Gharbi J, Hober D. Enteroviruses and type 1 diabetes: towards a better understanding of the relationship. Rev Med Virol.2010; 20:265–80.
18. Kahn HS, Morgan TM, Case LD et al. Association of type 1 diabetes with month of birth among U.S. youth: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. Diabetes Care.2009; 32:2010–2015.
19. Moltchanova EV, Schreier N, Lammi N, Karvonen M. Seasonal variation of diagnosis of type 1 diabetes mellitus in children worldwide. Diabet Med.2009; 26:673–78.
20. Laitinen OH, Honkanen H, Pakkanen O et al. Coxsackievirus B1 is associated with induction of beta-cell autoimmunity that portends type 1 diabetes. Diabetes.2014; 63:446–55.
21. Anagandula M, Richardson SJ, Oberste MS et al. Infection of human islets of Langerhans with two strains of Coxsackie B virus serotype 1: assessment of virus replication, degree of cell death and induction of genes involved in the innate immunity pathway. J Med Virol.2014; 86:1402–11.
22. Benson AK, Kelly SA, Legge R et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:18933– 38.
23. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature.2009; 457:480–4.

24. Khachatryan ZA, Ktsoyan ZA, Manukyan GP, Kelly D, Ghazaryan KA, Aminov RI. Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut microbiota. *PLoS One*. 2008; 3, e3064.
25. Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM et al. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Med*. 2013; 11:46.
26. Mejia-Leon ME, Petrosino JF, Ajami NJ, Dominguez-Bello MG, de la Barca AM. Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. *Sci Rep*. 2014; 4:3814.
27. Endesfelder D, zu Castell W, Ardisson A et al. Compromised gut microbiota networks in children with anti-islet cell autoimmunity. *Diabetes*. 2014; 63:2006–14.
28. Giongo A, Gano KA, Crabb DB et al (2011) Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *ISME J* 5:82–91.
29. Kostic AD, Gevers D, Siljander H et al (2015) The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe* 17:260–273.
30. Steck AK, Rewers MJ. Genetics of type 1 diabetes. *Clin Chem*. 2011; 57:176–185.
31. Gough SC, Simmonds MJ. The HLA region and autoimmune disease: associations and mechanisms of action. *Curr Genomics*. 2007; 8:453–465.
32. Mangalam AK, Taneja V, David CS. HLA class II molecules influence susceptibility versus protection in inflammatory diseases by determining the cytokine profile. *J Immunol*. 2013; 190: 513–18.
33. Redondo MJ, Fain PR, Eisenbarth GS. Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog Horm Res*. 2001; 56:69–89.
34. Onengut-Gumuscu S, Chen WM, Burren O et al. Fine mapping of type 1 diabetes susceptibility loci and evidence for colocalization of causal variants with lymphoid gene enhancers. *Nat Genet*. 2015; 47:381–86.
35. Salminen KK, Vuorinen T, Oikarinen S, Helminen M, Simell S, Knip M, Ilonen J, Simell O, Hyöty H. Isolation of enterovirus strains from children with preclinical Type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2004; 21:156–64.

36. Kulmala P, Savola K, Reijonen H, Veijola R, Vähäsalo P, Karjalainen J, Tuomilehto-Wolf E, Ilonen J, Tuomilehto J, Akerblom HK, Knip M. Genetic markers, humoral autoimmunity, and prediction of type 1 diabetes in siblings of affected children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetes*. 2000; 49: 48-58.
37. Mainardi-Novo DT, Santos AS, Fukui RT, Gamberini M, Correia MR, Ruiz MO, Manguera CL, Matioli SR, Vasconcelos DM, Silva ME. The PTPN22 1858T allele but not variants in the proximal promoter region of IL-21 gene is associated with the susceptibility to type 1 diabetes and the presence of autoantibodies in a Brazilian cohort. *Clin Exp Immunol*. 2013; 172(1):1622.
38. Kupila A, Keskinen P, Simell T et al (2002) Genetic risk determines the emergence of diabetes-associated autoantibodies in young children. *Diabetes* 51:646–51.
39. Ziegler AG, Rewers M, Simell O et al (2013) Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *JAMA* 309:2473–9.
40. Cabrera SM, Chen Yi-G, Hagopian Aw, Hessner JM. Blood-based signatures in type 1 diabetes. 2016, 59:414–25.
41. Keller MP, Attie AD, Physiological insights gained from gene expression analysis in obesity and diabetes. *Annu Rev. Nutr* 2010; 30:341-64.
42. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. 2004; *Cell* 116:281-297.
43. Tang G. siRNA and miRNA: An insight into RISCs. *Trends Biochem Sci*. 2005; 30:106-14.
44. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA- mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet*. 2007; 23:243-9.
45. Dumortier O, Hinault C, Van Obberghen E. MicroRNAs and metabolism crosstalk in energy homeostasis. *Cell Metab*. 2013; 18:312–24.
46. Fernandez-Hernando C, Ramirez CM, Goedeke L, Suarez Y. MicroRNAs in metabolic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33:178–185.

47. Guay C, Regazzi R. Role of islet microRNAs in diabetes: which model for which question? *Diabetologia*.2015; 58:456–63.
48. Weber JA, Baxter DH, Zhang S et al . The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*.2010; 56:1733–41.
49. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM et al.Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:5003–8.
50. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*.2011; 13:423–33.
51. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ . Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*.2010; 38:7248–59.
52. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*.2010; 9:654– 59.
53. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H et al.Delivery of microRNA-126 by apoptoticbodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* .2009;2:ra81.
54. Guay C, Regazzi R . Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*.2013; 9:513–21.
55. Chien HY, Lee TP, Chen CYet al.Circulating microRNA as a diagnostic marker in populations with type 2 diabetes mellitus and diabetic complications. *J Chin Med Assoc JCMA*.2015; 78:204–11.
56. de Planell-Saguer M, Rodicio MC. Detection methods for microRNAs in clinic practice. *Clin Biochem*.2013; 46:869–78.
57. Nielsen LB, Wang C, Sorensen K et al.Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression. *Exp Diabetes Res*. 2012; 896362.

58. Osipova J, Fischer DC, Dangwal S et al. Diabetes associated microRNAs in paediatric patients with type 1 diabetes mellitus: a cross-sectional cohort study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99:E1661–E5.
59. Bijkerk R, Duijs JM, Khairoun M et al. Circulating microRNAs associate with diabetic nephropathy and systemic microvascular damage and normalize after simultaneous pancreas–kidney transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transplant Surg.* 2015; 15:1081–1090.
60. Hezova R, Slaby O, Faltejskova P et al. MicroRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. *Cell Immunol.* 2010; 260: 70–4.
61. Salas-Perez F, Codner E, Valencia E, Pizarro C, Carrasco E, PerezBravo F. MicroRNAs miR-21a and miR-93 are down regulated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with type 1 diabetes. *Immunobiology.* 2013; 218:733–37.
62. Takahashi P, Xavier DJ, Evangelista AF et al. MicroRNA expression. profiling and functional annotation analysis of their targets in patients with type 1 diabetes mellitus. *Gene.* 2014;539:213–23.
63. Balasubramanyam M, Aravind S, Gokulakrishnan K et al. Impaired miR146a expression links subclinical inflammation and insulin resistance in Type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2011;351:197–205.
64. Luo M, Li R, Deng X et al. Platelet-derived miR-103b as a novel biomarker for the early diagnosis of type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 2015; -015-0733-0.
65. Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the microRNA spectrum between serum and plasma. 2012; *PLoS One* 7, e41561 72.
66. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75:843-54.
67. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nat.* 2004;431:350-5.
68. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005; 120(1): 15-20.

69. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Sci*. 2007; 318:1931–34.
70. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:1608–13.
71. Zhao Y, He S, Liu C, Ru S, Zhao H, Yang Z, Yang P, Yuan X, Sun S, Bu D, Huang J, Skogerbo G, Chen R. MicroRNA regulation of messenger-like noncoding RNAs: a network of mutual microRNA control. *Trends Genet*. 2008; 24:323–32.
72. Pulkkinen K, Malm T, Turunen M, Koistinaho J, Ylä-Herttuala S. Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo Ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210. *FEBS Lett*. 2008; 582: 2397–401
73. Niu Z, Li A, Zhang SX, Schwartz RJ. Serum response factor micromanaging cardiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 2007; 19:618–27.
74. Lukiw WJ, Pogue AI. Induction of specific micro RNA (miRNA) species by ROS-generating metal sulfates in primary human brain cells. *J Inorg Biochem* 2007; 101:1265–69.
75. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:175–205
76. Cho WC. MicroRNAs in cancer from research to therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1805:209–17.
77. Eacker SM, Dawson TM, Dawson VL. Understanding microRNAs in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10:837–41.
78. Kumar M, Nath S, Prasad HK, Sharma GD, Li Y. MicroRNAs: a new ray of hope for diabetes mellitus. *Protein Cell*. 2012; 3: 726–38.
79. Cai BZ, Pan ZW, Lu YJ. The roles of microRNAs in heart diseases: a novel important regulator. *Curr Med Chem* 2010; 17:407–11.
80. Liang M, Liu Y, Mladinov D, Cowley AW Jr, Trivedi H, Fang Y, Xu X, Ding X, Tian Z. MicroRNA: a new frontier in kidney and blood pressure research. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 297:F553–58.
81. Chen XM. MicroRNA signatures in liver diseases. *World J Gastroenterol* 2009; 15:1665–72.

82. Tsitsiou E, Lindsay MA. MicroRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9:514–20
83. Singh SK, Bhadra MP, Girschick HJ, Bhadra U. MicroRNAs – micro in size but macro in function. *FEBS Journal*, 2008; 275: 4929-44.
84. Schmittgen TD. Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer. *J Cell Mol Med*, 2008; 12: 1811-19.
85. Sun BK, Tsao H. Small RNAs in development and disease. *J Am Acad Dermatol*, 2008; 59: 725-37.
86. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nat*. 2004; 432:226–30.
87. Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RH. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* 2007; 5:e203.
88. Baroukh N, Ravier MA, Loder MK, Hill EV, Bounacer A, Scharfmann R, Rutter GA, Van Obberghen E. MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines. *J Biol Chem* 2007; 282:19575–88.
89. Poy MN, Spranger M, Stoffel M. microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9:67–73.
90. Kato M, Zhang J, Wang M, Lanting L, Yuan H, Rossi JJ, Natarajan R. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:3432–37.
91. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA, Walker NM, Rich SS; Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 2009; 41:703-7.

92. De Gobbi M, Viprakasit V, Hughes JR, Fisher C, Buckle VJ, Ayyub H, Gibbons RJ, Vernimmen D, Yoshinaga Y, de Jong P, Cheng JF, Rubin EM, Wood WG, Bowden D, Higgs DR. A regulatory SNP causes a human genetic disease by creating a new transcriptional promoter. *Science* 2006; 312:1215-17.
93. Zhou L, He H, Mi X, Li CM, Lee B, Mi Q. MicroRNA genes: are they susceptibility candidates for human type 1 diabetes? *Immunol. Diabetes* 2008; 1150:72-5.
94. Sebastiani G, Vendrame F, Dotta F. MicroRNAs as new tool for exploring type 1 diabetes: relevance for immunomodulation and transplantation therapy. *Transplant. Proc.* 2011a; 43:330-2.
95. Lovis P, Gattesco S, Regazzi R. Regulation of the expression of components of the machinery of exocytosis of insulin-secreting cells by microRNAs. *Biol Chem* 2008; 389:305–12.
96. Plaisance V, Abderrahmani A, Perret-Menoud V, Jacquemin P, Lemaigre F, Regazzi R. MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *J Biol Chem* 2006; 281:26932–42.
97. Pandey AK, Agarwal P, Kaur K, Datta M. MicroRNAs in diabetes: tiny players in big disease. *Cell Physiol Biochem.* 2009; 23: 221-32.
98. Cuellar TL, McManus MT. MicroRNAs and endocrine biology. *J. Endocrinol.* 2005; 187: 327-32.
99. Joglekar MV, Parekh VS, Hardikar AA. New pancreas from old: Microregulators of pancreas regeneration. *Trends Endocrinol Metab.* 2007; 18:393-400.
100. Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, Heim MH, Stoffel M. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature.* 2011; 474: 649-53.
101. Zhu H, Shyh-Chang N, Segrè AV, Shinoda G, Shah SP, Einhorn WS, Takeuchi A, Engreitz JM, Hagan JP, Kharas MG, Urbach A, Thornton JE, Triboulet R, Gregory RI; DIAGRAM Consortium; MAGIC Investigators, Altshuler D, Daley GQ. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell.* 2011; 147:81-94.

102. Valencia E, Codner E, Salas-Pérez F, Pizarro C, Carrasco P E, Arredondo M, Pérez-Bravo F. High glucose concentration in T1D patients modulates apoptotic protein expression: down regulation of BAX and FAS and up regulation of XIAP. *Hum Immunol.* 2012; 73: 801-4.
103. Tang X, Gal J, Zhuang X, Wang W, Zhu H, Tang G. A simple array platform for microRNA analysis and its application in mouse tissues. *RNA.* 2007;13: 1803-22.
104. Itoh N, Okamoto H. Translational control of proinsulin synthesis by glucose. *Nat.* 1980; 283: 100-2.
105. Ohneda K, Ee H, German M. Regulation of insulin gene transcription. *Semin Cell Dev Biol.* 2000; 11:227-33.
106. Wicksteed B, Herbert TP, Alarcon C, Lingohr MK, Moss LG, Rhodes CJ. Cooperativity between the preproinsulin mRNA untranslated regions is necessary for glucose-stimulated translation. *J Biol Chem.* 2001; 276: 22553-58.
107. Schuit F, Flamez D, De Vos A, Pipeleers D . Glucose- regulated gene expression maintaining the glucose- responsive state of β -cells. *Diabetes.* 2002; (Suppl 3) 51: S326-S32.
108. Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmon JS Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr.* 2006; 136:873-6.
109. Tang X, Muniappan L, Tang G, Ozcan S. Identification of glucoseregulated miRNAs from pancreatic {beta} cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription. *RNA.* 2009; 15:287-93.
110. El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein Kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 2008; 57:2708-17.
111. Joglekar MV, Joglekar VM, Hardikar AA. Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development. *Gene expression Patterns* 2009; 9: 109-13.

112. Baroukh N, Ravier MA, Loder MK, Hill EV, Bounacer A, Scharfmann R, Rutter GA, Van Obberghen E .MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic β -cell lines. *J Biol Chem.*2007; 282:19575-88.
113. Keller DM, McWeeney S, Arsenlis A, Drouin J, Wright CV, Wang H, Wollheim CB, White P, Kaestner KH, Goodman RH . Characterization of pancreatic transcription factor Pdx-1 binding sites using promoter microarray and serial analysis of chromatin occupancy. *J Biol Chem.* 2007; 282:32084-92.
114. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N .Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 2005; 37:495-500.
115. Mi QS, He HZ, Dong Z, Isales C, Zhou L. microRNA deficiency in pancreatic islet cells exacerbates streptozotocin-induced murine autoimmune diabetes. *Cell Cycle.* 2010; 15:3127-29.
116. Roggli E, Britan A, Gattesco S, Lin-Marq N, Abderrahmani A, Meda P, Regazzi R.Involvement of MicroRNAs in the Cytotoxic Effects Exerted by Proinflammatory Cytokines on Pancreatic β -Cells. *Diabetes.* 2010; 59: 978-86.
117. van de Bunt M, Gaulton KJ, Parts L, Moran I, Johnson PR, Lindgren CM, Ferrer J, Gloyn AL, McCarthy MI. The miRNA profile of hump pancreatic islets and beta-cells and relationship to type 2 diabetes pathogenesis. *Plos One.* 2013; 8(1): e55272.
118. Guay C, Roggli E, Nesca V, Jacovetti C, Regazzi R.Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Transl Res.* 2011; 157(4):253-64.
119. Fei J, Li Y, Zhu X, Luo X . miR-181a post-transcriptionally downregulates oncogenic RalA and contributes to growth inhibition and apoptosis in chronic myelogenous leukemia (CML)., *PLoS One.* 2012; 7: e32834.
120. Qin W, Shi Y, Zhao B, Yao C, Jin L, Ma J, Jin Y . miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PLoS One.*2010; 5: e9429.

121. Razumilava N, Bronk SF, Smoot RL, Fingas CD, Werneburg NW, Roberts LR, Mott JL. miR-25 targets TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) death receptor-4 and promotes apoptosis resistance in cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2012; 55: 465–75.
122. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, Davuluri R, Liu CG, Croce CM, Negrini M, Calin GA, Ivan M. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol*, 2007; 27: 1859–67.
123. Bushati N, Cohen SM. miRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007; 23:175–205.
124. Erener S, Mojibian M, Fox JK, Denroche HC, Kieffer TJ. Circulating miR375 as a biomarker of β -cell death and diabetes in mice. *Endocrinol*. 2013; 154:603-8.
125. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP: MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Sci*. 2004; 303:83-6.
126. Baltimore D, Boldin MP, O'connell RM, Rao DS, Taganov KD: MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* 2008, 9:839-45.
127. Xiao C, Rajewsky K: MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 2009, 136:26-36.
128. Lindsay MA: microRNAs and the immune response. *Trends Immunol*. 2008; 29:343-51.
129. Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, Hood LE, Galas DJ: Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106(11):4402–7.
130. Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, Li K, Yu B, Li Z, Wang R, Wang L, Li Q, Wang N, Shan H, Li Z, Yang B: Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 391(1):73–77.
131. Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, Konishi H, Morimura R, Deguchi K, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E: Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer* 2010, 102(7):1174–79.

132. Zhu W, Qin W, Atasoy U, Sauter ER: Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res Notes* 2009, 2:89.
133. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulton J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL: Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008, 141(5):672–5.
134. Bianchi F, Nicassio F, Marzi M, Belloni E, Dall'olio V, Bernard L, Pelosi G, Maisonneuve P, Veronesi G, Di Fiore PP: A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer. *EMBO Mol Med* 2011, 3(8):495–503.
135. Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sultmann H: Serum microRNAs as noninvasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer* 2010, 9:306.
136. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB: Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008, 3(11):e3694.
137. Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW: Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One* 2011, 6(6):e20769.
138. Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V, Papageorgiou E, Dervenoulas J: The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur J Haematol* 2010, 84: 1–16.
139. Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 7080–5.
140. Kirschner M B., Kao SC, Edelman JJ, Armstrong N J, Vallety M P., van Zandwijk N, Reid G. Haemolysis during Sample Preparation Alters microRNA Content of Plasma -2011 *PLoS ONE* 6(9): e24145.
141. Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 391: 73–7.

142. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer*.2010; 127: 118–126.
143. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* .2008;141: 672– 5.
144. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, et al. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg* .2010;251: 499–505.
145. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*.2008; 18: 997–1006.
146. Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*.2009; 58: 1375–1381.
147. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*.2008; 105: 10513–10518.
148. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*.2010; 31: 659–666.
149. Wang JF, Yu ML, Yu G, Bian JJ, Deng XM, et al. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun*.2010; 394: 184–188.
150. Guay C, Jacovetti C, Nesca V, Motterle A, Tugay K, Regazzi R. Emerging roles of non-coding RNAs in pancreatic β -cell function and dysfunction. *Diabetes, Obes Metab*. 2012; 14:12-21.
151. Pullen TJ, da Silva Xavier G, Kelsey G, Rutter GA. miR-29a and 29b contribute to pancreatic beta-cell specific silencing of monocarboxylate transporter 1 (Mct1). *Mol Cell Biol*. 2011; 31:3182-94.
152. Frost RJ, Olson EN. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 2107580.

153. Fernandez-Valverde SL, Taft RJ, Mattick JS. MicroRNAs in β -cell biology, insulin resistance, diabetes and its complications. *Diabetes*. 2011; 60: 1825-31.
154. Sebastiani G, et al., MicroRNA expression fingerprint in serum of type 1 diabetic patients. *Diabetologia*. 2012; 55, S48.
155. Fornari T A. Controle pós-transcricional em timócitos e linfócitos T CD3⁺ periféricos de camundongos NOD durante a emergência do 155. Fornari T.A, Controle pós transcricional em timócitos e linfócitos TCD3⁺ periféricos de camundongos NOD durante a emergência do Diabetes mellitus do tipo 1. (Tese de Doutorado) -USP Ribeirão Preto. 2011.
156. Roggli E, Gattesco S, Caille D, Briet C, Boitard C, Meda P, Regazzi R. Changes in microRNA expression contribute to pancreatic β -cell dysfunction in prediabetic NOD mice. *Diabetes*. 2012; 61:1742-51.
157. Hezova R, Slaby O, Faltejskova P, Mikulkova Z, Buresova I, Raja KR, Hodek J, Ovesna J, Michalek J. microRNA-342, microRNA-191 and microRNA510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. *Cell Immunol*. 2010; 260:70-4.
158. Ha TY. MicroRNAs in Human Diseases: From Autoimmune Diseases to Skin, Psychiatric and Neurodegenerative Diseases. *Immune Netw*. 2011; 11(5): 227-44.
159. Wei B, Pei G. microRNAs: critical regulators in Th17 cells and players in diseases. *Cell Mol Immunol*. 2010; 7:175-81.
160. de Jong VM, Zaldumbide A, van der Slik AR, Persengiev SP, Roep BO, Koeleman BP Post-transcriptional control of candidate risk genes for type 1 diabetes by rare genetic variants. *Genes Immun*. 2013; 14:58-61.
161. Zhou L, He H, Mi JX, Li C, Lee B, Mi QS. MicroRNA genes. *Ann N Y Acad. Sci*, 2008; 1150:72-5.
162. Zhu S, Pan W, Qian Y. MicroRNA in immunity and autoimmunity. *J Mol Med*. 2013 (Review)
163. Olarerin-George AO, Anton L, Hwang YC, Elovitz MA, Hogenesch JB. A functional genomics screen for microRNA regulators of NF-KappaB signaling. *BMC Biol*. 2013;28:11-9.

164. Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*. 2008; 132:875-86.
165. Carlsen AL, Schetter AJ, Nielsen CT, Lood C, Knudsen S, Voss A, Harris CC, Hellmark T, Segelmark M, Jacobsen S, Bengtsson AA, Heegaard NH. Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2013; 65:1324-34.
166. Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, Li Z, Wu Z, Pei G. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat. Immunol*. 2009; 10(12):1252-9.
167. Sebastiani G, Grieco FA, Spagnuolo I, Galleri L, Cataldo D, Dotta F. Increased expression of microRNA miR-326 in type 1 diabetic patients with ongoing islet autoimmunity. *Diabetes metab Res Rev*. 2011; 27:862-6.
168. Chan EK, Ceribelli A, Satoh M. MicroRNA-146a in autoimmunity and innate immune responses. *Ann Rheum Dis*. 2013; 72: ii90-5.
169. Hu R, Huffaker TB, Kagele DA, Runtsch MC, Bake E, Chaudhuri AA, Round JL, O'Connell RM. MicroRNA-155 confers encephalogenic potential to Th17 cells by promoting effector gene expression. *J Immunol*. 2013; 190:597280.
170. Min S, Li L, Zhang M, Zhang Y, Liang X, Xie Y, He Q, Li Y, Sun J, Liu Q, Jiang X, Zhang Y, Che Y, Yang R. TGF- β -associated miR-27a inhibits dendritic cell-mediated differentiation of Th1 and Th17 cells by TAB3, p38 MAPK, MAP2k4 and MAP2k7. *Genes Immun*. 2012; 13(8): 621-31.
171. Barbagallo D, Piro S, Condorelli AG, Mascali LG, Urbano F, Parrinello N, Monello A, Statello L, Ragusa M, Rabuazzo AM, Di Pietro C, Purrello F, Purrello M. miR-296-3p, miR-298-5p and their downstream networks are casually involved in the higher resistance of mammalian pancreatic α cells to cytokine- induced apoptosis as compared to β cells. *BMC Genomics*. 2013; 14: 62.

172. Nesca V, Guay C, Jacovetti C, Menoud V, Peyot ML, Laybutt DR, Prentki M, Regazzi R. Identification of particular groups of microRNAs that positively or negatively impact on beta cell function in obese models of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2013;56(10):2203-12.
173. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB: Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008;3(11):e3694.
174. Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW: Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One* 2011, 6(6):e20769.
175. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 10513–18.
176. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*. 2010; 31: 659–66.
177. Wang JF, Yu ML, Yu G, Bian JJ, Deng XM, et al. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 394: 184–8.
178. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*. 2010 Apr;50(4):298-301.
179. Schmittgen TD¹, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8.
180. American Diabetes Association: Standards of Medical Care in Diabetes - 2017. *Diabetes Care* 2017; 40 (Suppl. 1):S1-S135.
181. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extraCTing DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 16 (3), 1998).1215

182. Gomes KF, Santos AS, Semzezem C, Correia MR, Brito LA, Ruiz MO, Fukui RT, Mاتيoli SR, Passos-Bueno MR, Silva ME. The influence of population stratification on genetic markers associated with type 1 diabetes. *Sci Rep.* 2017;7:43513.
183. Higuchi C, Nakatsuka A, Eguchi J, Kanzaki STM, Katayama A, Yamaguchi S, Takahashi N, Murakami D, Ogawa D, Sasaki S, Makino H, Wada J. Identification of Circulating miR-101, miR-375 and miR-802 as Biomarkers for Type 2 Diabetes. *Metabolism* 2015;64: 489–497.
184. Floris I, Descamps B, Vardeu A, Mitić T, Posadino AM, Shantikumar S, Sala-Newby G, Capobianco G, Mangialardi G, Howard L, Dessole S, Urrutia R, Pintus G, Emanuelli C. Gestational diabetes mellitus impairs fetal endothelial cell functions through a mechanism involving microRNA-101 and histone methyltransferase enhancer of zester homolog-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:664-674
185. Erener S, Marwaha A, Tan R, Panagiotopoulos C, Kieffer TJ. Profiling of circulating microRNAs in children with recent onset of type 1 diabetes. *JCI Insight.* 2017;2:e89656
186. Zhang Y, Feng ZP, Naselli G, Bell F, Wettenhall J, Auyeung P, Ellis JA, Ponsonby AL, Speed TP, Chong MM, Harrison LC. MicroRNAs in CD4(+) T cell subsets are markers of disease risk and T cell dysfunction in individuals at risk for type 1 diabetes. *J Autoimmun.* 2016; 68:52-61.
187. Takahashi P, Xavier DJ, Evangelista AF, Manoel-Caetano FS, Macedo C, Collares CV, Foss-Freitas MC, Foss MC, Rassi DM, Donadi EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET. MicroRNA expression profiling and functional annotation analysis of their targets in patients with type 1 diabetes mellitus. *Gene.* 2014; 539:213-23.
188. Tugay K, Guay C, Marques AC, Allagnat F, Locke JM, Harries LW, Rutter GA, Regazzi R. Role of microRNAs in the age-associated decline of pancreatic beta cell function in rat islets. *Diabetologia.* 2016 ;59:161-9.
189. Chan WC, Ho MR, Li SC, Tsai KW, Lai CH, Hsu CN, Lin WC. MetaMirClust: discovery of miRNA cluster patterns using a data-mining approach. *Genomics.* 2012 ;100:141-8.
190. Zheng Y, Wang Z, Tu Y, Shen H, Dai Z, Lin J, Zhou Z. miR-101a and miR-30b contribute to inflammatory cytokine-mediated β -cell dysfunction. *Lab Investigation* 2015; 95:1387–1397.

191. Zhu QY, Liu Q, Chen J-X, Lan K, Bao-Xue Ge B-X. MicroRNA-101 Targets MAPK Phosphatase-1 To Regulate the Activation of MAPKs in Macrophages. *J Immunol*. 2010;185:7435-42.
192. Cantley LG, Barros EJG, Gandhi M, Rauchman M, Nigam SK. Regulation of mitogenesis, motogenesis, and tubulogenesis by hepatocyte growth factor in renal collecting duct cells. *Am J Physiol* 1994; 267: F271–F280.
193. Hu Z, Lin Y, Chen H, Mao Y, Wu J, Zhu Y, Xu X, Xu X, Li S, Zheng X, Xie L. MicroRNA-101 suppresses motility of bladder cancer cells by targeting c-Met. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;435:82-7
194. Roccisana J, Reddy V, Vasavada RC, Gonzalez-Pertusa JA, Magnuson MA, Garcia-Ocaña A. Targeted inactivation of hepatocyte growth factor receptor c-Met in beta-cells leads to defective insulin secretion and GLUT-2 downregulation without alteration of beta-cell mass. *Diabetes* 2005;54:2090–2102.
195. Garcia-Ocaña A, Takane KK, Syed MA, Philbrick WM, Vasavada RC, Stewart AF. Hepatocyte growth factor overexpression in the islet of transgenic mice increases beta cell proliferation, enhances islet mass, and induces mild hypoglycemia. *J Biol Chem* 2000;275:1226–1232.
196. Garcia-Ocana A, Takane KK, Reddy VT, Lopez-Talavera J-C, Vasavada RC, Stewart AF. Adenovirus-mediated hepatocyte growth factor expression in mouse islets improves pancreatic islet transplant performance and reduces beta cell death. *J Biol Chem* 2003;278:343–351.
197. Tiago G. Araújo, Alexandre G. Oliveira, Bruno M. Carvalho, Dioze Guadagnini, André O.P. Protzek, Jose B.C. Carvalheira, Antonio C. Boschero, and Mario J.A. Saad. .Hepatocyte Growth Factor Plays a Key Role in Insulin Resistance-Associated Compensatory Mechanisms. *Endocrinology* 153: 5760–5769, 2012
198. Mellado-Gil J, Rosa TC, Demirci C, Gonzalez-Pertusa JA , Velazquez-Garcia S, Ernst S, Valle S, Vasavada RC, Stewart AF, Alonso LC, Garcia-Ocaña A. Disruption of Hepatocyte Growth Factor/c-Met Signaling Enhances Pancreatic b-Cell Death and Accelerates the Onset of Diabetes. *Diabetes* 2011; 60: 525–536.
199. Jain R, Lammert E. Cell-cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab*. 2009 ;11 Suppl 4:159-167.

200. Zhang Y, Kinkel S, Maksimovic J, Bandala-Sanchez E, Tanzer MC, Naselli G, Zhang JG, Zhan Y, Lew AM, Silke J, Oshlack A, Blewitt ME, Harrison LC. The polycomb repressive complex 2 governs life and death of peripheral T cells, *Blood* 2014;124:737-749.
201. Tumes DJ, Onodera A, Suzuki A, Shinoda K, Endo Y, Iwamura C, Hosokawa H, Koseki H, Tokoyoda K, Suzuki Y, Motohashi S, Nakayama T. The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4(+) T helper type 1 and type 2 cells. *Immunity*. 2013;39:819-32.
202. Liu J, Hua R, Gong Z, Shang B, Huang Y, Guo L, Liu T, Xue J. Human amniotic epithelial cells inhibit CD4+ T cell activation in acute kidney injury patients by influencing the miR-101-c-Rel-IL-2 pathway. *Mol Immunol*. 2017;81:76-84
203. Pham MN, von Herrath MG, Vela JL. Antigen-Specific Regulatory T Cells and Low Dose of IL-2 in Treatment of Type 1 Diabetes. *Front Immunol*. 2016;6:651
204. Yang J, Lu YW, Lu MM, Leng RX, Pan HF, Ye DQ. MicroRNA-101, mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinases phosphatase-1 in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2013;22:115-20
205. Chen J, Zhu J, Wang Z, Yao X, Wu X, Liu F, Zheng W, Li Z, Lin A. MicroRNAs Correlate with Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder in a Chinese Population. *Med Sci Monit*. 2017;23:2565-2583.
206. Sukma Dewi I, Hollander Z, Lam KK, McManus JW, Tebbutt SJ, Ng RT, Keown PA, McMaster RW, McManus BM, Gidlöf O, Öhman J. Association of Serum MiR-142-3p and MiR-101-3p Levels with Acute Cellular Rejection after Heart Transplantation. *PLoS One*. 2017;12:e0170842.
207. Jia X, Li X, Shen Y, Miao J, Liu H, Li G, Wang Z. MiR-16 regulates mouse peritoneal macrophage polarization and affects T-cell activation J. *Cell. Mol. Med*. 2016: 1898-1907.
208. Joglekar MV, Parekh VS, Mehta S, Bhonde RR, Hardikar AA. MicroRNA profiling of developing and regenerating pancreas reveal post-transcriptional regulation of neurogenin3. *Dev Biol*. 2007;311:603-12.

209. Jalabert A, Vial G, Guay C, Wiklander OP, Nordin JZ, Aswad H, Forterre A, Meugnier E, Pesenti S, Regazzi R, Danty-Berger E, Ducreux S, Vidal H, El-Andaloussi S, Rieusset J, Rome S. Exosome-like vesicles released from lipid-induced insulin-resistant muscles modulate gene expression and proliferation of beta recipient cells in mice. *Diabetologia*. 2016;59:1049-58.
210. Bork-Jensen J, Scheele C, Christophersen DV, Nilsson E, Friedrichsen M, Fernandez-Twinn DS, Grunnet LG, Litman T, Holmstrøm K, Vind B, Højlund K, Beck-Nielsen H, Wojtaszewski J, Ozanne SE, Pedersen BK, Poulsen P, Vaag A. Glucose tolerance is associated with differential expression of microRNAs in skeletal muscle: results from studies of twins with and without type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2015 ;58:363-73.
211. Lee DE, Brown JL, Rosa ME, Brown LA, Perry RA Jr, Wiggs MP, Nilsson MI, Crouse SF, Fluckey JD, Washington TA, Greene NP. microRNA-16 Is Downregulated During Insulin Resistance and Controls Skeletal Muscle Protein Accretion. *J Cell Biochem*. 2016 Aug;117(8):1775-87
212. Bras JP, Silva AM, Calin GA, Barbosa MA, Santos SG, Almeida MI. miR-195 inhibits macrophages pro-inflammatory profile and impacts the crosstalk with smooth muscle cells. *PLoS One*. 2017;12:e0188530.
213. Ding J, Huang S, Wang Y, Tian Q, Zha R, Shi H, Wang Q, Ge C, Chen T, Zhao Y, Liang L, Li J, He X. Genome-wide screening reveals that miR-195 targets the TNF- α /NF- κ B pathway by down-regulating I κ B kinase alpha and TAB3 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013 ;58:654-66.
214. Yang WM, Jeong HJ, Park SY, Lee W. Saturated fatty acid-induced miR-195 impairs insulin signaling and glycogen metabolism in HepG2 cells. *EBS Lett*. 2014;588:3939-46.
215. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Rovira O, Guerra E, Esteve E, Xifra G, Martínez C, Ricart W, Rieusset J, Rome S, Karczewska-Kupczewska M, Strackowski M, Fernández-Real JM. Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization. *Diabetes Care*. 2014;37:1375-83.

216. Cox MB, Cairns MJ, Gandhi KS, Carroll AP, Moscovis S, Stewart GJ, Broadley S, Scott RJ, Booth DR, Lechner-Scott J; ANZgene Multiple Sclerosis Genetics Consortium. MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood. *PLoS One*. 2010 ;5:e12132..
217. Gandhi R, Healy B, Gholipour T, Egorova S, Musallam A, Hussain MS, Nejad P, Patel B, Hei H, Khoury S, Quintana F, Kivisakk P, Chitnis T, Weiner HL. Circulating microRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2013;73:729-40.
218. Rodil-Garcia P, Arellanes-Licea EDC, Montoya-Contreras A, Salazar-Olivo LA. Analysis of MicroRNA Expression in Newborns with Differential Birth Weight Using Newborn Screening Cards. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12).
219. Belgardt BF, Ahmed K, Spranger M, Latreille M, Denzler R, Kondratiuk N, von Meyenn F, Villena FN, Herrmanns K, Bosco D, Kerr-Conte J, Pattou F, Rüdliche T, Stoffel M. The microRNA-200 family regulates pancreatic beta cell survival in type 2 diabetes. *Nat Med*. 2015;21:619-27.
220. Filios SR, Xu G, Chen J, Hong K, Jing G, Shalev A. MicroRNA-200 is induced by thioredoxin-interacting protein and regulates Zeb1 protein signaling and beta cell apoptosis. *J Biol Chem*. 2014 ;289:36275-83
221. Xu G, Chen J, Jing G, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein regulates insulin transcription through microRNA-204. *Nat Med*. 2013;19:1141–1146
222. Shyamasundar S, Jadhav SP, Bay BH, Tay SS, Kumar SD, Rangasamy D, Dheen ST. Analysis of epigenetic factors in mouse embryonic neural stem cells exposed to hyperglycemia. *PLoS One*. 2013;8:e65945..
223. Oger F, Gheeraert C, Mogilenko D, Benomar Y, Molendi-Coste O, Bouchaert E, Caron S, Dombrowicz D, Pattou F, Duez H, Eeckhoutte J, Staels B, Lefebvre P. Cell-specific dysregulation of microRNA expression in obese white adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:2821-33
224. Zárate-Neira LÁ, Sánchez-Barbosa S, Pedroza-Torres A, Reséndiz-Mora A, Wong C, Baeza I, Pérez-Plasencia C, Wong-Baeza C. Dysregulation of miR-155-5p and miR-200-3p and the Anti-Non-Bilayer Phospholipid Arrangement Antibodies Favor the Development of Lupus in Three Novel Murine Lupus Models. *J Immunol Res*. 2017;2017:8751642.

225. Wang XY, Chen XY, Li J, Zhang HY, Liu J, Sun LD. MiR-200a expression in CD4⁺ T cells correlates with the expression of Th17/Treg cells and relevant cytokines in psoriasis vulgaris: A case control study. *Biomed Pharmacother.* 2017 Sep;93:1158-1164.
226. Naghavian R, Ghaedi K, Kiani-Esfahani A, Ganjalikhani-Hakemi M, Etemadifar M, Nasr-Esfahani MH. miR-141 and miR-200a, Revelation of New Possible Players in Modulation of Th17/Treg Differentiation and Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *PLoS One.* 2015;10:e0124555.
227. Bakay M, Pandey R, Hakonarson H. Review Genes Involved in Type 1 Diabetes: An Update. *Genes* 2013, 4, 499-521.
228. Lemos NE, Dieter C, Dorfman LE, Assmann TS, Duarte GCK, Canani LH, Bauer AC, Crispim D. The rs2292239 polymorphism in ERBB3 gene is associated with risk for type 1 diabetes mellitus in a Brazilian population. *Gene.* 2018 ;644:122-128.
229. Bernardi S, Toffoli B, Tisato V, Bossi F, Biffi S, Lorenzon A, Zauli G, Secchiero P, Fabris B. TRAIL reduces impaired glucose tolerance and NAFLD in the high-fat diet fed mouse. *Clin Sci (Lond).* 2018 ;132:69-83.
230. Wang W, Gao J, Wang F. MiR-663a/MiR-423-5p are involved in the pathogenesis of lupus nephritis via modulating the activation of NF- κ B by targeting TNIP2. *Am J Transl Res.* 2017;9:3796-3803.
231. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Rovira O, Guerra E, Esteve E, Xifra G, Martínez C, Ricart W, Rieusset J, Rome S, Karczewska-Kupczewska M, Strackowski M, Fernández-Real JM. Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization. *Diabetes Care.* 2014;37:1375-83.
232. Liu Q, Gao Q, Zhang Y, Li Z, Mei X. MicroRNA-590 promotes pathogenic Th17 cell differentiation through targeting Tob1 and is associated with multiple sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;493:901-908.
233. De Jong VM, van der Slik AR, Laban S, van 't Slot R, Koeleman BP, Zaldumbide A, Roep BO. Survival of autoreactive T lymphocytes by microRNA-mediated regulation of apoptosis through TRAIL and Fas in type 1 diabetes. *Genes Immun.* 2016 Sep;17(6):342-8.

234. Su Y, Jiang X, Li Y, Li F, Cheng Y, Peng Y, Song D, Hong J, Ning G, Cao Y, Wang W. Maternal Low Protein Isocaloric Diet Suppresses Pancreatic β -Cell Proliferation in Mouse Offspring via miR-15b. *Endocrinology*. 2016;157:4782-4793.
235. Cui X, You L, Zhu L, Wang X, Zhou Y, Li Y, Wen J, Xia Y, Wang X, Ji C, Guo X. Change in circulating microRNA profile of obese children indicates future risk of adult diabetes *Metabolism*. 2018;78:95-105.
236. Assmann TS, Recamonde-Mendoza M, De Souza BM, Crispim D. MicroRNA expression profiles and type 1 diabetes mellitus: systematic review and bioinformatic analysis. *Endocr Connect*. 2017;6:773-790
237. Belongie KJ, Ferrannini E, Johnson K, Andrade-Gordon P, Hansen MK, Petrie JR. Identification of novel biomarkers to monitor β -cell function and enable early detection of type 2 diabetes risk. *PLoS One*. 2017;12:e0182932.
238. Ren D, Liu F, Dong G, You M, Ji J, Huang Y, Hou Y, Fan H. Activation of TLR7 increases CCND3 expression via the downregulation of miR-15b in B cells of systemic lupus erythematosus. *Cell Mol Immunol*. 2016;13:764-775.
239. Kim BS, Jung JY, Jeon JY, Kim HA, Suh CH. Circulating hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-92a-3p, and hsa-miR-223-3p may be novel biomarkers in systemic lupus erythematosus. *HLA*. 2016 Oct;88(4):187-93.
240. Pandis I, Ospelt C, Karagianni N, Denis MC, Reczko M, Camps C, Hatzigeorgiou AG, Ragoussis J, Gay S, Kollias G. . Identification of microRNA-221/222 and microRNA-323-3p association with rheumatoid arthritis via predictions using the human tumour necrosis factor transgenic mouse model. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:1716-1723.
241. Hezova R, Slaby O, Faltejskova P, Mikulkova Z, Buresova I, Raja KR, Hodek J, Ovesna J, Michalek J. microRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. *Cell Immunol*. 2010;260:70-74.
242. Chakraborty C, Doss CG, Bandyopadhyay S, Agoramoorthy G. Influence of miRNA in insulin signaling pathway and insulin resistance: micro-molecules with a major role in type-2 diabetes. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2014;5:697-712.

243. Li Y, Luo T, Wang L, Wu J, Guo S. MicroRNA-19a-3p enhances the proliferation and insulin secretion, while it inhibits the apoptosis of pancreatic β cells via the inhibition of SOCS3. *Int J Mol Med*. 2016 Nov;38(5):1515-1524.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PACIENTE

1

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PACIENTE**

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 de microRNAs séricos no Diabetes tipo 1 autoimune

PESQUISADOR: Maria Elizabeth Rossi da Silva

CARGO/FUNÇÃO: Médica **INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA Nº** 19.981

UNIDADE DO HCFMUSP: Endocrinologia e Metabologia –LIM-18 Depto. Clínica Médica

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 04 anos

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

Rubrica do pesquisador.....

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

1. Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa pesquisar genes que predisõem ao aparecimento do diabetes tipo 1. Para isto será necessária a coleta de amostra de sangue que será utilizada para avaliar o papel dos glóbulos brancos na inflamação que favorece o diabetes.
2. Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros. Não há
3. Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço. (20mL)
4. Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3. Desconforto, dor e hematoma no local da coleta do sangue .
5. Benefícios para o participante. Este estudo visa identificar genes que atuam em 3 fases do diabetes: a) numa fase anterior ao aparecimento do diabetes tipo 1; b) Nos primeiros meses após o diagnóstico; c) numa fase mais tardia, após 2 a 5 anos do diagnóstico . Estas determinações permitirão verificar se exames de sangue podem ser utilizados para avaliar a evolução do diabetes e se poderão ser úteis em tratamentos futuros e prevenção. Não há benefício direto para o participante
6. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva que pode ser encontrada no endereço Av. Dr Arnaldo, 455 3º andar sala 3324, telefone (011) 3061-7258. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: cappelq@hcnet.usp.br
7. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.
8. Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.
9. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.
10. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.
11. Parte deste sangue colhido será armazenado para estudos futuros que possam contribuir para o melhor entendimento da doença e, em consequência, o seu tratamento, com a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa. As amostras armazenadas ficarão sob responsabilidade da Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva, no Laboratório de Investigação Médica 18 (LIM-18) da Faculdade de Medicina da USP. Você decide se podemos manter as amostras não utilizadas após o final da pesquisa. Se os resultados destas pesquisas futuras tiverem importância para sua saúde, você poderá ser contatado(a). Toda pesquisa feita com as amostras armazenadas será antes autorizada por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

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 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.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "**Expressão de microRNAs séricos no diabetes tipo 1 autoimune**".

Eu discuti com a Dra Maria Elizabeth Rossi da Silva sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

APÊNDICE 2

APROVAÇÃO PLATAFORMA BRASIL

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DA USP - HCFMUSP**

COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

Título da Pesquisa: Expressão de microRNAs séricos no diabetes tipo 1 autoimune

Pesquisador: Maria Elizabeth Rossi da Silva

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

Versão: 1

CAAE: 24542713.0.0000.0068

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 098572/2013

Informamos que o projeto Expressão de microRNAs séricos no diabetes tipo 1 autoimune que tem como pesquisador responsável Maria Elizabeth Rossi da Silva, foi recebido para análise ética no CEP

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP - HCFMUSP em 10/12/2013 às 16:08.

APROVAÇÃO PLATAFORMA BRASIL

Título da Pesquisa: Expressão de microRNAs séricos no diabetes tipo 1 autoimune

Pesquisador: Maria Elizabeth Rossi da Silva

Área	Genética Humana:
Temática:	(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.)

Versão: 1

CAAE: 24542713.0.0000.0068

Submetido em: 10/12/2013

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

Situação: Aprovado

Localização atual do Projeto: Pesquisador Responsável

Patrocinador Principal: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

APÊNDICE 3

PARECER SUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE ÉTICA

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 <small>(uso reservado à Secretaria da CAPPesq)</small>	
Nº do Protocolo:	Tipo: Humanos
Instituto: ICHC	
Registro on-line nº: 11601	Data de Entrada: 07/11/2013

Este projeto envolve:

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

1. Título do Protocolo de Pesquisa

Expressão de microRNAs séricos no diabetes tipo 1 autoimune

2. Palavras-chaves que caracterizam o assunto da Pesquisa

diabetes tipo 1 autoimune,HLA, RNA, biomarcadores, microRNA.

3. Resumo do Protocolo de Pesquisa:

O Diabetes tipo 1 é uma doença com predisposição hereditária, caracterizada pela heterogeneidade genética e baixa penetrância na transmissão familiar. Os indivíduos afetados desenvolvem a doença de acordo com a susceptibilidade genética, influenciada principalmente por haplótipos relacionados ao complexo principal de histocompatibilidade (HLA), que codifica as moléculas HLA-classe II, além de inúmeros outros genes que condicionam a resposta imunológica. Recentemente, um novo mecanismo de regulação pós transcricional dos genes, desempenhado por pequenos RNAs de 21-25 nucleotídeos não codificadores de fita simples, denominados microRNAs (miRNAs ou miRs), tem auxiliado na compreensão de diversos processos biológicos e doenças. Seu conhecimento permitirá, no futuro, a introdução de mecanismos capazes de bloquear ou retardar o processo de destruição autoimune. O fato de os microRNAs estarem implicados na regulação da imunidade inata e adaptativa, e nas respostas das células T e B, sugere sua atuação neste processo. Considerando a possível associação entre marcadores inflamatórios no sangue periférico e no pâncreas, optamos por analisar o perfil dos microRNAs em amostras de soro de pacientes pré-diabéticos e portadores de diabetes mellitus autoimune e compará-lo com controles normais. Serão selecionados aqueles

miRNA's implicados na expressão de genes das vias inflamatórias e secreção de insulina. Objetivos: Determinar os miRNAs circulantes relevantes na resposta imunológica, na diferenciação das células Beta pancreáticas, na secreção de insulina e verificar seu papel na patogênese do DM1A. Caracterizar e comparar o perfil de expressão de miRNAs em amostras de soro dos indivíduos: a) sem diabetes e com autoanticorpos pancreáticos positivos, b) pacientes com diabetes de início recente (< 6 meses) e aqueles com 2 a 5 anos de duração da doença. Comparar com controles normais. Selecionar os miRNAs com expressão diferencial entre os grupos e analisar seu papel biológico - seus genes alvos no envolvimento do DM1A. A predição e análise dos genes alvos será feita através do software IPA (Ingenuity® Systems), que avalia as interações microRNA-RNA preditos. A expressão dos miRNAs relacionados com vias inflamatórias e de seus genes alvos será quantificada em RNA extraído de células mononucleares (PBMC) de sangue periférico, por ensaios TaqMan- qRT PCR. A expressão dos miRNAs será também relacionada com os autoanticorpos pancreáticos e as concentrações de Peptídeo C séricos.

4. Pesquisador Responsável:

Dra Maria Elizabeth Rossi da Silva

<http://lattes.cnpq.br/7882543321339398>

Graduação: Medicina

Vínculo: HC

5. Pesquisador Executante:

Aritania Sousa Santos

<http://lattes.cnpq.br/2282492976068621>

6. Possui co-autores?

Sim

Nome dos co-autores: Prof.Dr.Edécio Cunha Neto

7. Onde a Pesquisa será realizada?

Departamento: Clínica Médica

Disciplina: Endocrinologia e Metabologia

LIM: LIM/18 - Lab Carboidratos e Radioimunoensaios

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

Sim

Laboratório de Imunologia e Alergia - LIM-60

12. Finalidade acadêmica da pesquisa e classificação

Doutorado

Outros;

Orientador: Dra Maria Elizabeth Rossi da Silva

13. Investigação

Retrospectiva e Prospectiva (Ambos)

14. Materiais e métodos

Laboratorial

Entrevistas e questionários

Tecidos, órgãos, fluidos orgânicos