



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *NFKB*,  
*MCPI/CCL2* E *IL18* COM O DESENVOLVIMENTO DA NEFROPATIA EM  
PACIENTES COM *DIABETES MELLITUS* TIPO 1**

**THAMARA RODRIGUES DE MELO**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. VIVIAN NOGUEIRA SILBIGER**  
**CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. ADRIANA AUGUSTO DE REZENDE**

**NATAL**

**2014**

**THAMARA RODRIGUES DE MELO**

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *NFKB*,  
*MCPI/CCL2* E *IL18* COM O DESENVOLVIMENTO DA NEFROPATIA EM  
PACIENTES COM *DIABETES MELLITUS* TIPO 1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, na Área de Concentração Bioanálises como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. VIVIAN NOGUEIRA SILBIGER**  
**CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. ADRIANA AUGUSTO DE REZENDE**

**NATAL**  
**2014**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte -  
UFRNSistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde -  
CCS

Melo, Thamara Rodrigues de.

Estudo da associação dos genes TLR2, TLR4, MYD88, NFKB, MCP1/CCL2 e IL18 com o desenvolvimento da nefropatia em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 / Thamara Rodrigues de Melo. - Natal, 2014.

64f.: il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vivian Nogueira Silbiger.

1. Nefropatia diabética - Dissertação. 2. Diabetes mellitus tipo 1 - Dissertação. 3. Citocinas - Dissertação. 4. Expressão gênica - Dissertação. I. Silbiger, Vivian Nogueira. II. Título.

RN/UF/BSA01

CDU 616.379-008.64

THAMARA RODRIGUES DE MELO

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *NFKB*,  
*MCP1/CCL2* E *IL18* COM O DESENVOLVIMENTO DA NEFROPATIA  
EM PACIENTES COM *DIABETES MELLITUS* TIPO 1**

**Banca Examinadora:**



Prof. Dra. Vivian Nogueira Silbiger  
Presidente – UFRN



Prof. Dra. Maria Cristina Foss Freitas  
Examinador Externo – USP



Prof. Dr. Guilherme Maranhão Chaves  
Examinador Interno – UFRN



Prof. Dra. Adriana Augusto de Rezende  
Examinador Interno – UFRN

Natal, 30 de junho de 2014

**NATAL / RN**

**2014**

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus amados pais, Edmundo e Maria, exemplos de caráter, de determinação e de perseverança, que sempre me incentivaram nas minhas decisões e escolhas, acreditando na minha capacidade e ensinando-me a superar as dificuldades com dignidade e honestidade, além de serem motivos de imenso orgulho para mim.**

**A minha adorável irmã, Thamiles, por quem eu tenho profundo carinho e que me apoia de maneira singular para que eu possa alcançar os meus objetivos.**

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que me deu força e sabedoria para superar todas as adversidades encontradas nessa trajetória.

**Aos meus pais e minha irmã**, pelo amor, admiração e respeito. Pelo apoio nas horas mais difíceis e compreensão pela minha ausência em muitos momentos.

À **Profa. Dra. Adriana Augusto de Rezende**, por abrir as portas do seu laboratório mesmo não me conhecendo, pela orientação, pelos ensinamentos e oportunidade de concretizar este trabalho.

À **Profa. Dra. Vivian Nogueira Silbiger** pela colaboração para desenvolvimento de estudo.

À **Profa. Dra. Maria das Graças Almeida** pelos ensinamentos para formação profissional.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Fernando Arrais** e sua equipe pela dedicação a Unidade de Endocrinologia Pediátrica/UFRN e valorosa colaboração com este trabalho.

À todos os **profissionais do Hospital de Pediatria Professor Heriberto Ferreira Bezerra/UFRN**, pela disponibilidade e cooperação.

Aos **diretores e coordenadores das escolas públicas** pela recepção acolhedora, disponibilidade e apoio para realização deste trabalho.

À todas as **crianças, adolescentes e seus pais e/ou responsáveis** que participaram neste trabalho e cederam suas esperanças em busca de algo melhor para todos.

Ao **CNPq e FAPERN** pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À **Capes/REUNI** pela bolsa de estudo e aos professores do estágio docência assistida na disciplina Fundamentos Microbiologia, Parasitologia e Imunologia pelos valor ensinamentos contribuindo para minha formação profissional.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** pela contribuição na formação profissional.

Aos funcionários **Aureliana e Fábيا**, pela amizade, pelo carinho e ajuda.

À todos os funcionários do **Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas** da UFRN.

À todos os **laboratórios da Faculdade de Farmácia** contribuíram direta ou indiretamente com equipamentos para a idealização desta pesquisa e outras pesquisas.

À **Anderson Leão**, pelo companheirismo, paciência e pelo extremo incentivo.

À meus amigos, da Família LABMULT: **André Luchessi, Ciele, Fabrício Melo, Felipe, João Felipe Bezerra, Gabriel Araújo, Gustavo Oliveira, Leandro Moraes, Raul Bortolin, Thaynnan Arruda e Vínicius Xavier**, pelos momentos divididos juntos, as angústias e alegrias. E a equipe “Força Diabetes”, formada por **Heglayne Vital, Karla Souza, Marcela Ururahy e Melina Loureiro** pela dedicação, paciência nos momentos de insegurança, compreensão nos momentos difíceis durante essa trajetória, e principalmente a alegria de concretizar este trabalho. Muito Obrigada!

E meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a idealização desta pesquisa.

**“Por mais árdua que seja a luta, por mais distante que um ideal se apresente, por mais difícil que seja a caminhada, existe sempre uma maneira de vencer: A Nossa Fé”.**

**(Paulo Coelho)**

## RESUMO

A inflamação tem sido descrita como fator importante para desenvolvimento de doenças crônicas como o diabetes, e a condição da hiperglicemia seria responsável pela ativação de receptores *toll-like* (TLRs) e citocinas e conseqüentemente pela indução da inflamação local e sistêmica. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a associação da expressão de RNAm dos genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *NFKB*, *MCPI/CCL2* e *IL18* em células mononucleares do sangue periférico de crianças, adolescentes e adultos jovens com *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) com o estado pró-inflamatório e alteração da função renal nestes pacientes. Foram estudados 49 indivíduos normoglicêmicos (NG) e 49 pacientes com DM1, entre 6 e 20 anos. Os pacientes diabéticos foram analisados em sua totalidade (grupo DM1) e, subdivididos em dois grupos, de acordo com o controle glicêmico: diabéticos compensados (grupo DM1C) e diabéticos não compensados (grupo DM1NC). Avaliou-se a glicemia de jejum, hemoglobina glicada, ureia, creatinina séricas, proteínas totais e frações e relação albumina/creatinina (RAC) urinária dos indivíduos estudados. Também foi determinada a expressão do RNAm dos genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *NFKB*, *MCPI/CCL2* e *IL18* através da técnica da PCR em tempo real (Taqman<sup>®</sup>). A maioria dos indivíduos com DM1 (65,3%) apresentou controle glicêmico insatisfatório (hemoglobina glicada >8%). Em relação à função renal, observou-se um aumento significativo nos valores da RAC nos grupos DM1 (p=0,006) e DM1NC (p=0,008) em relação ao NG. No tocante aos marcadores bioquímicos como proteínas totais e frações, houve um aumento das concentrações séricas das proteínas totais no grupo DM1 (p=0,044) e das concentrações de globulinas nos grupos DM1 (p<0,001), DM1C (p<0,001) e DM1NC (p<0,001) quando comparados ao grupo NG. Nas análises moleculares foram observadas um aumento significativa na expressão do *TLR2* (p = 0,003), *TLR4* (p = 0,006), *MYD88* (p = 0,015), *NFKB* (p = 0,035) para o grupo DM1 em relação ao NG. Também houve aumento significativo em relação ao *TLR2* (p=0,017) e *NFKB* (p=0,035) para o grupo DM1NC em relação ao NG. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de *MCPI/CCL2* e *IL18* entre os grupos e subgrupos. Estes resultados sugerem que o controle glicêmico insatisfatório, em conjunto com o estado inflamatório pode ser mediado pela ativação de *TLR2* e *TLR4*, podendo contribuir para o desenvolvimento de futuras complicações, como a nefropatia diabética.

**Palavras-chave:** *Diabetes mellitus* tipo 1, inflamação, receptor *toll-like*, citocinas, expressão gênica e nefropatia diabética.

## ABSTRACT

Inflammation has been described as an important development factor for chronic diseases, such as diabetes and the condition of hyperglycemia would be responsible for activation of toll-like receptors (TLRs) and cytokines and consequently the induction of local and systemic inflammation. In this sense, the objective of this study was to evaluate the association of the mRNA expression of *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *NFKB*, *MCPI/CCL2* and *IL18* genes in peripheral blood mononuclear cells of children, adolescents and young adults with type 1 diabetes with pro-inflammatory state of *Diabetes mellitus* type 1 (DM1) and abnormal renal function. 49 normoglycemic individuals (NG) and 49 patients with DM1, between 6 and 20 years were studied. Diabetic patients were analyzed as a whole (group DM1), and subdivided into two groups according to glycemic control: offset diabetics (DM1C group) and diabetic uncompensated (DM1NC group). We evaluated fasting glucose, glycated hemoglobin, urea, serum creatinine, total protein fractions and albumin/creatinine ratio (ACR) urinary individuals studied. mRNA expression of *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *NFKB*, *MCPI/CCL2* and *IL18* genes was also determined using the technique of real time PCR (Taqman®). Most individuals with DM1 (65.3%) had poor glycemic control (glycated hemoglobin >8%). With respect to renal function, we observed a significant increase in the values of ACR groups DM1(p=0.006) and DM1NC(p=0.008) compared to NG. Regarding the biochemical markers such as total protein fractions (p=0.044) and an increase in serum concentrations of total protein in DM1 group, and concentrations of globulins in DM1(p<0.001), DM1C(p<0.001) and DM1NC (p<0.001) group when compared to the NG group. In the molecular analysis, significant increase in the expression of *TLR2* (p = 0.003), *TLR4* (p = 0.006), *MYD88* (p = 0.015) and *NFKB* (p = 0.035) for DM1 group compared to NG were observed. A significantly increased expression of *TLR2* (p=0.017) e *NFKB* (p=0.035) to DM1NC group compared to NG was also observed. No significant differences were observed in expression of *IL18* and *MCPI/CCL2* between groups and subgroups. These results suggest that poor glycemic control, together with the presence of risk factors and the inflammatory state associated with hyperglycemia may be mediated by activation of TLR-2 and TLR-4, which may contribute to the development of future complications, such as diabetic nephropathy.

**Keywords:** Type 1 diabetes, inflammation, toll-like receptor, cytokine, gene expression and diabetic nephropathy.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**18S** – Gene que codifica o RNA ribossomal 18S

**ADA** - *American Diabetes Association*

**AGEs** – *Advanced Glycation End-products*

**APC** – *Antigen – Presenting Cells*

**CCS/UFRN** – Centro de Ciências da Saúde da UFRN

**cDNA**- DNA complementar

**CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**CNS** – Conselho Nacional de Saúde

**Ct** – *Ciclo threshold*

**DCCT**- *Diabetes Control and Complications Trial*

**DEPC** – *Diethyl dicarbonate*

**DM**- *Diabetes Mellitus*

**DM1**- *Diabetes Mellitus* tipo 1

**DM1C**- Diabético compensado

**DM1NC**- Diabético não-compensado

**DM2** - *Diabetes Mellitus* tipo 2

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DP** – Desvio padrão

**EDTA**- Ácido etilenodiamino tetraacético

**ERK** – *Extracelular signal regulated kinases*

**FAPERN** – Fundação de Apoio à Pesquisas do Rio Grande do Norte

**GADPH**- Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

**HDL**- Lipoproteína de alta densidade

**HLA** – Antígeno Leucocitário Humano

**HMB1**- Proteína do grupo de alta mobilidade

**HOSPED/UFRN** – Hospital de Pediatria Professor Heriberto Bezerra da UFRN

**IFN- $\gamma$**  – Interferon gama

**IKK**- I $\kappa$ B quinase

**IL-18** - Interleucina 18

**IRAK**- *Interleukin-1 receptor associated kinase*

**IRF**- *INF- regulatory factor*

**I $\kappa$ B**- *Inhibitor of NF- $\kappa$ B*

**JNK** - *Jun N-terminal kinase*

**LABIOMOL/UFRN** – Laboratório de Biologia Molecular da UFRN

**LABMULT/UFRN** – Laboratório Multidisciplinar da UFRN

**LDL** - Lipoproteína de baixa densidade

**LIATEC** – Laboratório Integrado de Análises Toxicológicas e Clínicas

**MAPK** – Mitogen- activated protein

**MCP-1** - Proteína quimiotática de monócitos 1

**MHC** - Complexo Principal de Histocompatibilidade

**MOPS** – Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico

**MyD88** – *Myeloid differentiation primary-response protein 88*

**NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*

**ND** - Nefropatia Diabética

**NF $\kappa$ B** - Fator nuclear  $\kappa$ B

**NG** - Normoglicêmico

**PAMPS** – Padrões moleculares associados a patógenos

**PBMCs** – Células mononucleares do sangue periférico

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**PKC** - Proteína quinase C

**PPgCF/UFRN** – Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas da UFRN

**PRR** - Receptores de Reconhecimento Padrão

**RAC** - Relação albumina/creatinina

**RNA** - Ácido ribonucleico

**RNA<sub>m</sub>** – RNA mensageiro

**SBD** - Sociedade Brasileira de Diabetes

**TBE** – Tampão tris-borato-EDTA

**TBK**- *TRAF family member –associated NF- $\kappa$ B activator binding kinase*

**TGF- $\beta$ 1** – Fator de transformação do crescimento beta 1

**TLR** - Receptor toll-like

**TLR 2** - Receptor toll like 2

**TLR 4** - Receptor toll like 4

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

**TRIF** - TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$

**UBC** – Gene que codifica a proteína ubiquitina C

**UFRN** – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

**VIGITEL** – Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Patogênese do DM1	<b>19</b>
<b>FIGURA 2</b> - Vias inflamatórias envolvidas na patogênese da nefropatia diabética	<b>22</b>
<b>FIGURA 3</b> - Sinalização dos Receptores <i>Toll-like</i>	<b>25</b>
<b>FIGURA 4</b> - Distribuição dos indivíduos estudados de acordo com classificação socioeconômica e os grupos de estudo	<b>38</b>
<b>FIGURA 5</b> - Distribuição dos indivíduos estudados de acordo com a naturalidade	<b>39</b>
<b>FIGURA 6</b> - Correlações entre RAC e controle glicêmico no grupo diabético total.	<b>42</b>
<b>A:</b> RAC x Glicose; <b>B:</b> RAC x Hemoglobina Glicada	
<b>FIGURA 7</b> - Expressão de RNAm em PBMCs dos genes <i>TLR2</i> , <i>TLR4</i> , <i>MYD88</i> , <i>NFKB</i> , <i>MCPI/CCL2</i> e <i>IL18</i> , normalizados pela <i><math>\beta</math>-actina</i> , nos grupos estudados.	<b>44</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Iniciadores e sondas utilizados para a seleção do gene de referência.	<b>33</b>
<b>TABELA 2</b> - Estabilidade dos genes de referência testados na população de estudo, utilizando o NormFinder e o programa Genorm.	<b>34</b>
<b>TABELA 3</b> - Iniciadores e sonda utilizados para a avaliação da expressão do gene <i>TLR2</i> , <i>TLR4</i> e <i>MYD88</i> .	<b>35</b>
<b>TABELA 4</b> - Características dos ensaios prontos para os genes <i>NFKB</i> , <i>MCP1</i> e <i>IL18</i> utilizados em suas análises de expressão gênica.	<b>35</b>
<b>TABELA 5</b> - Características demográficas dos grupos estudados.	<b>40</b>
<b>TABELA 6</b> - Parâmetros bioquímicos avaliados de acordo com os grupos de estudo.	<b>43</b>

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1 <i>Diabetes mellitus</i> : Epidemiologia, classificação e fisiopatologia	17
1.2 Inflamação e Nefropatia diabética	20
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>29</b>
3.1 Tipo de Estudo	29
3.2 Aspectos Éticos e Financeiros	29
3.3 Casuística	29
3.3.1 Grupo diabético tipo 1 – DM1	29
3.3.2 Grupo normoglicêmico – NG	30
3.4 Amostras Biológicas	30
3.5 Determinação dos Parâmetros Bioquímicos	31
3.6 Análise da expressão de RNAm dos genes <i>TLR2</i> , <i>TLR4</i> , <i>MYD88</i> , <i>NFKB</i> , <i>MCPI/CCL2</i> e <i>IL18</i> em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)	31
3.6.1 Extração do RNA total de sangue periférico	31
3.6.2 Obtenção do cDNA	32
3.6.3 Seleção do gene de referência	32
3.6.4 Análise da expressão de RNAm dos genes <i>TLR2</i> , <i>TLR4</i> , <i>MYD88</i> , <i>NFKB</i> , <i>MCPI/CCL2</i> e <i>IL18</i> pela PCR em Tempo Real	34
<b>4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b>	<b>37</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>38</b>
5.1 Caracterização da população de estudo	38

5.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos	41
5.3 Avaliação da expressão dos genes <i>TLR2</i> , <i>TLR4</i> , <i>MYD88</i> , <i>NFKB</i> , <i>MCPI/CCL2</i> e <i>IL18</i>	44
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>53</b>
<b>APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>58</b>
<b>APÊNDICE B – FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO 1 - PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPED/UFRN</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO 2 - CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO ECONÔMICA BRASIL</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO 3 - VALORES DE REFERÊNCIA PARA OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS</b>	<b>64</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Diabetes Mellitus*: Epidemiologia, classificação e fisiopatologia

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma importante doença crônica que afeta a sociedade moderna. Sua incidência e prevalência vêm aumentando em todos os países, alcançando proporções epidêmicas, o que o caracteriza como um problema de saúde pública. As complicações do DM comprometem a produtividade, qualidade de vida e sobrevida do indivíduo, além de envolver altos custos no seu tratamento (ADA, 2014; SBD, 2014).

Em todo o mundo cerca de 382 milhões de indivíduos são diabéticos com prevalência mundial de 8,3% (IDF, 2013). Estudos realizados pela Organização Mundial de Saúde projeta que impactos crescentes dessa patologia que em 2035 será a sétima causa de morte no mundo, com estimativa de 592 milhões de indivíduos. Cerca de dois terços desses indivíduos com DM vivem em países em desenvolvimento onde a epidemia tem maior intensidade, com crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens (WHITING et al., 2011).

O DM apresenta alta morbidade e mortalidade sendo uma importante causa de morte, seja diretamente ou devido às suas complicações. As consequências humanas, sociais e econômicas são devastadoras 5,1 milhões de mortes por ano relativas ao diabetes e suas complicações, o que representa 8,6% da mortalidade mundial. Estudos brasileiros sobre mortalidade por DM, analisando as causas múltiplas de morte, ou seja, quando existe menção ao DM na declaração de óbito, mostram que a taxa de mortalidade por essa enfermidade aumenta até 6,4 vezes (SBD, 2014).

No Brasil, de acordo com Federação Internacional de Diabetes no ano de 2013 estimou-se que havia 11,9 milhões de diabéticos, com a prevalência anual de 9,04%. Estudos realizados Vigilância de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), do Ministério da Saúde, mostra a prevalência, em todas as 26 capitais brasileiras e no Distrito Federal, verificou que a capital com maior número de pessoas que relatam diagnóstico de diabetes foi Fortaleza, com 7,5% de casos, enquanto em Natal esse número foi de 5,8% (VIGITEL BRASIL, 2013).

O DM é definido como um grupo de alterações metabólicas, caracterizado por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Sendo assim, a Associação Americana de Diabetes (2014), classifica o DM em 4 categorias clínicas: diabetes tipo 1 (DM1), resultante da destruição das células beta pancreáticas, levando à deficiência

absoluta de insulina; diabetes tipo 2 (DM2), deficiência progressiva na secreção de insulina e a resistência; outros tipos específicos, como por exemplo, MODY, induzidas por drogas ou produtos químicos, doenças do pâncreas exócrino e infecções; e diabetes gestacional, diagnosticado durante a gravidez.

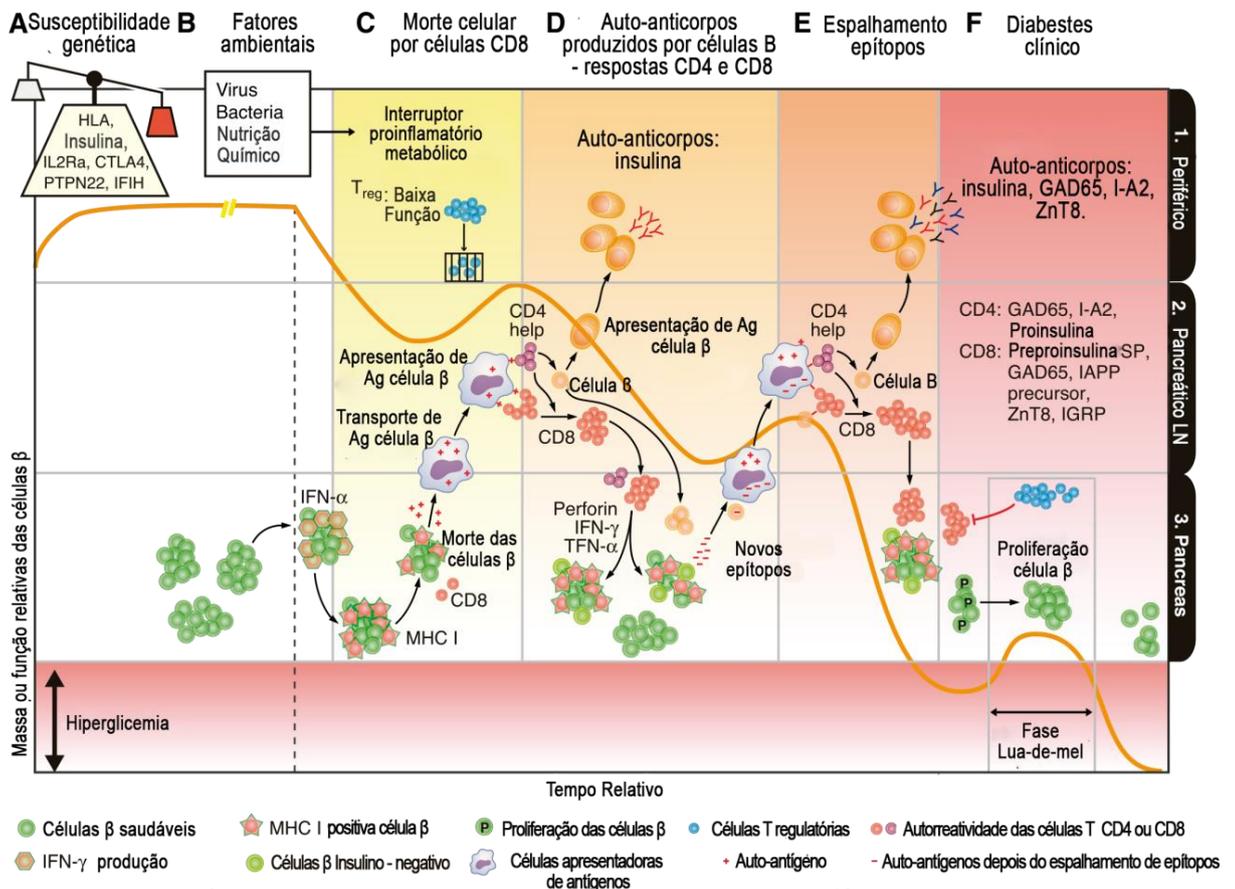
Ao longo dos últimos 20 anos, relata-se a incidência cada vez maior do diabetes mellitus no início da infância, no qual o DM1 afeta 15 milhões de crianças em todo o mundo, um aumento de 2 a 5% anual (WASHINGTON et al., 2012).

O DM1 é responsável por aproximadamente 5 – 10% do total de casos de diabetes (ADA, 2014), acometendo de 10 a 20 milhões de pessoas em todo o mundo. Baseado em informações Federação Internacional Diabetes (2013), o DM1 é uma das doenças crônicas e metabólicas mais comuns em crianças e adolescentes. Existem aproximadamente 497.100 indivíduos com idade inferior a 15 anos com diabetes no mundo. A incidência do DM1 demonstra acentuada variação geográfica, apresentando taxas por 100 mil indivíduos com menos de 15 anos de idade: de 57,6 na Finlândia; 10,4 no Brasil; e 0,6 na Coreia, por exemplo. Esta incidência do DM1 vem aumentando, particularmente na população infantil com menos de 5 anos de idade.

A etiologia do DM1 é complexa e poligênica, e dentre os fatores que conferem susceptibilidade à doença o mais bem descrito é a influência do antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigen*), localizado no cromossomo 6, onde dois haplótipos principais da molécula HLA II são reconhecidos como importantes marcadores de susceptibilidade para o DM1 (STECK; REWERS, 2011). O desenvolvimento desta patologia compreende uma complexa interação entre fatores ambientais, imunológicos e genéticos, que estão implicados como desencadeantes da autoimunidade (GRIECO et al., 2011; PINO; KRUGER; BORTELL, 2011).

O processo de destruição das células beta no DM1 ocorre quando antígenos pancreáticos das células betas são apresentados aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> por células apresentadoras de antígenos (APC do inglês *Antigen – Presenting Cells*). As APCs secretam interleucina-12 (IL-12) que levam as células T CD4<sup>+</sup> a secretarem interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e IL-2. Este IFN- $\gamma$  subsequentemente estimulam os macrófagos e células T CD8<sup>+</sup> a liberarem radicais livres e citocinas tais como, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a IL-1 $\beta$  e IL-6, resultando na apoptose das células beta. As células T CD4<sup>+</sup> também estimulam os linfócitos B a participarem da patogenia do DM1, seja apresentando auto-antígenos, entre eles, a anti-

ilhota, anti-insulina e anti-GAD (do inglês, *glutamic acid decarboxilase*) ou, ainda, como plasmócitos secretores de auto-anticorpos. Após o período agudo, 60% dos pacientes costumam entrar em uma fase de remissão, também conhecida como “*Honey moon*” ou “lua de mel”, que é caracterizada pela diminuição da necessidade de insulina exógena para a manutenção do controle metabólico, pela recuperação parcial das células beta. Desta maneira, ao longo do tempo, as células betas diminuem em número, assim como a intensidade do processo inflamatório até a sua falência total. (VAN BELLE et al., 2011) (FIGURA 1).



**FIGURA 1** – Patogênese do DM1. (Fonte: Adaptado VAN BELLE; COPPIETERS; HERRATH, 2011).

A instalação do DM1 cursa com aparecimento das manifestações agudas clássicas do diabetes: poliúria, polidipsia e perda de massa corporal, podendo ser observadas polifagia e visão turva (ADA, 2014). Essas alterações podem ser explicadas, pois o estado hiperglicêmico causa glicosúria, induzindo a diurese osmótica e, conseqüentemente, poliúria, causando uma intensa perda de água e eletrólitos. Essa perda de água através de eliminação renal associada

com a hiperosmolaridade, devido à alta concentração de glicose sanguínea, ativa receptores da sede cerebrais, causando a polidipsia. Finalmente, a polifagia resulta do catabolismo de proteínas e lipídeos, como resultado do comprometimento da insulina. Entretanto, apesar do aumento do apetite, o efeito catabólico permanece, resultando em perda de massa corporal e enfraquecimento muscular. A perda de massa corporal é inicialmente devida à perda de água, glicogênio e triglicérides; e posteriormente, a redução de massa muscular é atribuída ao desequilíbrio catabólico muscular (gliconeogênese), induzido pela diminuição dos níveis de insulina, que leva a uma transformação de aminoácidos em glicose e corpos cetônicos (DUARTE et al., 2005; VAN BELLE; COPPIERTERS; HERRATH, 2011).

Já as complicações em longo prazo do diabetes incluem retinopatia, com potencial perda de visão; nefropatia, levando à falência renal; neuropatia periférica, com risco de úlceras e amputação de membros; neuropatia autônoma, causando sintomas gastrintestinais, geniturinários e cardiovasculares, além de disfunções sexuais (ADA, 2014; CHO et al., 2011; DEMIREL et al., 2013) e osteopenia (LOUREIRO et al., 2014). Os pacientes diabéticos também apresentam uma maior predisposição à hipertensão, anormalidades no metabolismo de lipoproteínas e doenças vasculares (ADA, 2014; SINGH et al., 2014).

## **1.2 Receptor *toll-like* e Nefropatia Diabética**

A inflamação tem sido apontada como um fator importante no desenvolvimento de várias doenças crônicas, incluindo câncer, aterosclerose e diabetes. A condição da hiperglicemia é mediada ou modulada, pelo menos parcialmente, pela ativação dos receptores *toll-like* (TLR, do inglês *toll-like receptor*) no diabetes (DASU; RAMIREZ; ISSEROFF, 2012; URURAHY et al., 2012).

Durante a última década, é crescente o número de pesquisas que mostram as relações entre a inflamação e o desenvolvimento e progressão da nefropatia diabética que envolve complexas redes moleculares e processos. Os mecanismos exatos que conduzem esse processo ainda não são totalmente esclarecidos. Evidências crescentes indicam que a ativação da imunidade inata, com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória crônica é um fator reconhecido na patogênese desta doença (FORBES; COOPER, 2013; LIM; TESCH, 2012; WADA; MAKINO, 2013).

A nefropatia diabética (ND) é o dano renal mais comum no DM1, sendo uma das principais causas de insuficiência renal crônica em adultos (LEWIS; MAXWELL, 2014). Esta doença é dividida em duas fases de acordo com o diagnóstico laboratorial: albuminúria, com valores de albumina eliminada na urina entre 30-300mg/24h ou de creatinina entre 30-300mg/g; e macroalbuminúria ou proteinúria, quando a concentração de albumina atinge  $\geq 300\text{mg}/24\text{h}$  ou creatinina  $\geq 300\text{mg}/\text{g}$  (ADA, 2014; JHA; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2014).

A hipótese de que a albuminúria poderia refletir uma doença renal nos pacientes diabéticos foi postulada por *Bright* em 1836. Cem anos mais tarde, os efeitos renais tardios do diabetes mellitus foram descritos por *Kimmelstiel e Wilson* em 1936. Esses autores descreveram lesões intercapilares glomerulares em pacientes com DM2 de longa duração. Desde então, tem havido considerável empenho para a melhor compreensão dessa entidade clínica (SALGADO, 2007).

A fisiopatologia da nefropatia diabética envolve hipertensão capilar glomerular, hiperfiltração glomerular, expansão da matriz mesangial e glomerulosclerose (ARORA; SINGH, 2013). Algumas alterações na função renal usualmente já podem ser observadas na instalação do diabetes, como hiperfiltração glomerular, aumento do fluxo sanguíneo renal e hipertrofia dos rins. Grande parte destas alterações pode ser revertida no estágio inicial se um controle glicêmico e pressórico satisfatório for realizado, entretanto pode persistir em diversos pacientes e contribuir para o desenvolvimento da nefropatia diabética em longo prazo (LEWIS; MAXWELL, 2014; SUN et al., 2013).

Estudos epidemiológicos sugerem que a história natural da nefropatia no DM1 e DM2 são idênticas, com 30-50% dos pacientes desenvolvendo albuminúria nos primeiros 20 anos após o diagnóstico (HARJUTSALO; GROOP, 2014). Apesar de a nefropatia diabética ser incomum durante a infância e adolescência, os estágios iniciais da doença renal podem se manifestar logo após a instalação do diabetes. Além disso, durante e após a puberdade, há um risco aumentado de desenvolver a nefropatia, indicando uma possível influência das mudanças hormonais ocorridas nessa faixa etária (CHERNEY et al., 2012).

Vários fatores de risco podem estar envolvidos na instalação ou progressão da doença, tais como controle glicêmico, hipertensão, dislipidemias, puberdade, histórico familiar de complicações decorrentes do diabetes, e fatores genéticos (HARJUTSALO; GROOP, 2014).



pulmões, intestinos, fígado e rins (DASU; RAMIREZ; ISSEROFF, 2012; LIM; TESCH, 2012; TAKEDA; AKIRA, 2005).

Os receptores *toll-like* foram descritos pela primeira vez em 1980 através da identificação do primeiro membro desta proteína em *Drosophila melanogaster*. Relatos na literatura demonstra que Gay e Keith foram os primeiros que perceberam esses receptores *Drosophila* apresentava similaridades com receptor de IL-1 humano, em humanos só foram descritos em 1997. Até momento foram identificados mais de 11 diferentes TLRs em humanos e 13 em camundongos. A ativação desses receptores permite que o sistema imune diferencie moléculas próprias de estruturas não-próprias associadas a patógenos antes de iniciar a resposta imune, como também reconhecem diversas moléculas próprias expressas pelo organismo, denominados ligantes endógenos (KAWAI; AKIRA, 2010; LIN; TANG, 2014).

Os TLRs são amplamente divididos em dois subgrupos dependendo da sua localização celular e seus respectivos ligantes. Um grupo é constituído por TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 e TLR-11, que são expressos na superfície celular e reconhecem os componentes da membrana, principalmente produtos microbianos tais como lipídios, lipoproteínas e proteínas; o outro grupo é composto de TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9, que são expressos exclusivamente em compartimentos intracelular, como o retículo endoplasmático, endossomos e lisossomos, para que haja reconhecimento dos ácidos nucleicos microbianos (KAWAI; AKIRA, 2010).

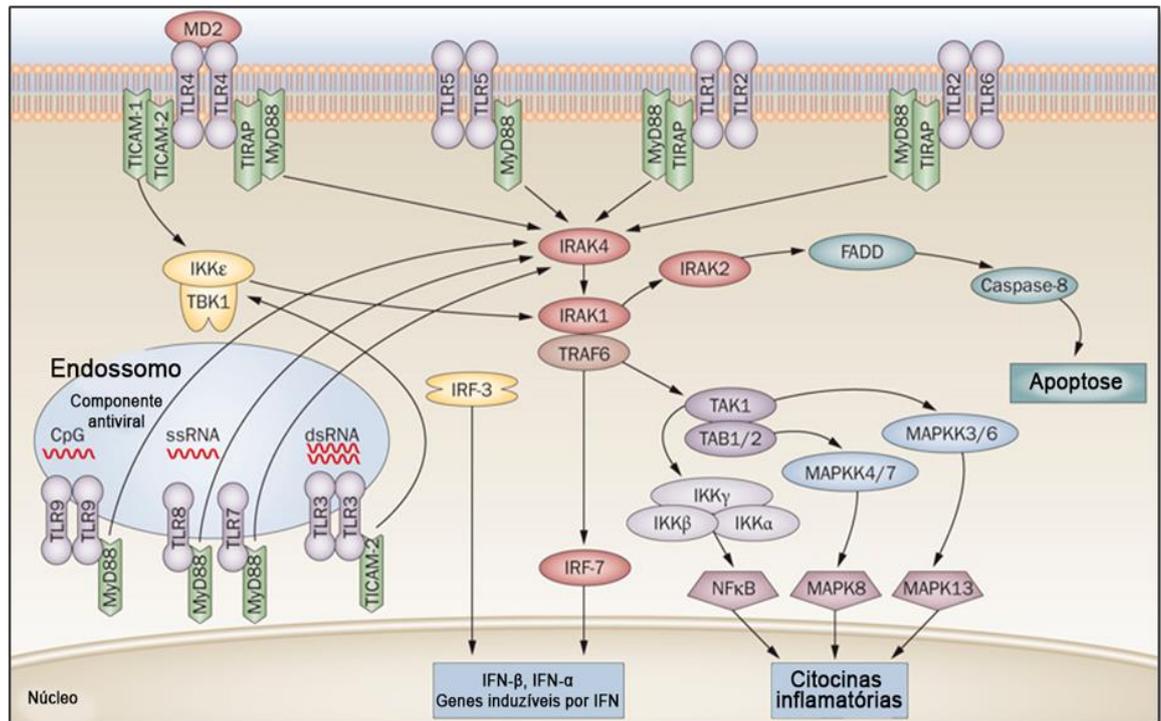
Além de ligantes dos receptores do tipo TLR derivados de patógenos, um crescente número de ligantes endógenos vem sendo descritos como estimuladores de TLRs, em particular TLR-2 e TLR-4, incluindo produtos finais de glicação avançada, fragmentos de ácido hialurônico, biglicana, células necróticas, componentes da matriz celular e proteína amilóide A sérica. Estes componentes poderiam estar sendo reconhecidos por estes receptores levando uma resposta inflamatória, envolvendo importantes citocinas pró-inflamatórias (FUKATA; VAMADEVAN; ABREU, 2009; KAWAI; AKIRA, 2011).

Estudos recentes demonstram que receptores TLR-2 e TLR-4 através de ligantes endógenos como proteína do grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1) e fibronectina são reguladas positivamente em presença de altas concentrações de glicose e hipóxia, que são fundamentais para desenvolvimento da nefropatia diabética (MUDALIAR et al., 2013).

Os caminhos de sinalização ativados pelos TLRs são amplamente classificados em MyD88-dependente ou MyD88-independente, visto que o MyD88 (proteína 88 de resposta primária à diferenciação mielóide) é uma proteína adaptadora universal recrutada por quase todos os TLRs, com exceção apenas do TLR3. Os principais caminhos ativados pelos TLR induzem a degradação do I $\kappa$ B e ativação *NFKB*, que por sua vez ativa citocinas inflamatórias e moléculas de adesão. Esses caminhos regulam o balanço entre a viabilidade celular e a inflamação (DASU; RAMIREZ; ISSEROFF, 2012; FUKATA; VAMADEVAN; ABREU, 2009).

As cascatas de sinalização ativadas por um TLR específico pelas proteínas adaptadoras recrutadas através da ligação com domínio intracelular TLR. As quatro proteínas adaptadoras citosólicas desempenham um papel fundamental na especificidade na sinalização mediado por TLR (KAWAI; AKIRA, 2011).

No caminho de sinalização Myd88 – dependente IRAK1 e IRAK4 são fosforilados e se dissociam do complexo, levando a ativação de TRAF6, que sofre ubiquitinação e ativa MAPKs ( ERK, JNK e p38) e o complexo IKK, levando à degradação de I $\kappa$ B e ativação do NF- $\kappa$ B. Enquanto na via de sinalização Myd88 – independente ocorre a ativação da proteína adaptadora TRIF, que complexa com IRF3 levando a fosforilação de IRF3 por TBK-1e a indução de genes de IFN tipo 1 que induz a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (FUKATA; VAMADEVAN; ABREU, 2009; KAWAI; AKIRA, 2011) (**FIGURA 3**).



**FIGURA 3** - Sinalização do Receptor *Toll-like* (FONTE: Adaptado GLUBA et al., 2010).

Estudos realizados em monócitos de pacientes com DM1 relataram uma elevação da expressão de *TLR2* e *TLR4*, desencadeando uma resposta pró-inflamatória. A resposta inflamatória foi evidenciada pelo aumento da atividade de *NFKB* e pela concentração aumentada de  $IL-1\beta$  quando comparados com indivíduos saudáveis, suportando a relação entre os TLRs, inflamação e o DM1 (DEVARAJ et al., 2011).

Diversos estudos apontam o envolvimento dos TLR no desenvolvimento de doenças renais (KAUR; CHIEN; JIALAL, 2012; LIN; TANG, 2014; MUDALIAR et al., 2013; URURAHY et al., 2012). A expressão de RNAm de *TLR* em rins saudáveis ou doentes é descrita na literatura. Esses receptores são encontrados tanto nas células renais intrínsecas quanto em células imunes infiltrantes. Modulam a resposta do rim a diversas doenças como sepse, isquemia, doenças envolvendo imuno-complexos, proteinúria e rejeição ao transplante renal (DEVARAJ et al., 2011; GLUBA et al., 2010; WADA; MAKINO, 2013).

O gene humano *TLR2* está localizado no cromossomo 4 (4q32), tem 21,8kb de tamanho e contém 3 éxons que codificam uma proteína de 784 aminoácidos. Estudos sugerem que o

*TLR2* é um importante iniciador da resposta inflamatória que leva ao dano e disfunção renal, através da indução a expressão de citocinas pelas células epiteliais tubulares durante o dano imune (JHA; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2014; LIN; TANG, 2014). A ativação imune mediada por TLR pode ocorrer durante qualquer tipo de dano renal pela exposição a um crescente número de moléculas exógenas ou endógenas (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011; WADA; MAKINO, 2013).

O *TLR4* humano está localizado no cromossomo 9 (9q32-33), com 13,2kb de tamanho e com 3 éxons contidos neste gene codificam uma proteína de 839 aminoácidos. Desempenha um papel importante na inflamação renal através de vias independente e dependente de MyD88. O aumento da expressão de *TLR4* em células renais intrínsecas e leucócitos foi relatada por contribuir em várias doenças renais agudas e crônicas (LIN; TANG, 2014).

Entre os fatores de transcrição mais importantes envolvidos na fisiopatologia da nefropatia diabética, é NF- $\kappa$ B por ser um elemento fundamental na interação entre fatores metabólicos e hemodinâmicos. O *NFKB* está localizado no cromossomo 4, posição 4p24 e os 24 éxons contidos neste gene codificam uma proteína de 969 aminoácidos. É um regulador de transcrição que é ativado por vários estímulos intra e extra-celulares, que após sua ativação transloca para o núcleo e estimula a expressão de genes envolvidos em uma ampla variedade de funções biológicas. Ativação inadequada deste gene tem sido associada com uma série de doenças inflamatórias, enquanto a inibição persistente leva ao desenvolvimento de células imunes ou inadequado crescimento celular retardado (KUZMICKI et al., 2013; LORENZO et al., 2011).

Além disso, evidências crescentes indicam que NF- $\kappa$ B é central para muitos caminhos interligados que contribuem para as mudanças estruturais e funcionais observadas na nefropatia diabética, incluindo a ativação do sistema renina-angiotensina, o acúmulo de AGE, e NADPH-dependente proveniente do estresse oxidativo (ELMARAKBY; SULLIVAN, 2012).

A nefropatia diabética é considerada uma doença inflamatória pelo importante papel que desempenham as citocinas e quimiocinas nos mecanismos imunopatológicos para o desenvolvimento e progressão desta patologia (MORESCO et al., 2013).

Durante o processo de desenvolvimento da nefropatia diabética, as quimiocinas e seus receptores desempenham papéis fundamentais na migração das células imunes para os tecidos

renais. O *CCL2* também conhecido como proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) é um gene humano está localizado no cromossomo 17, na posição 17q11.2-q12, e os 3 éxons contidos neste gene codificam uma proteína de 99 aminoácidos. A MCP-1 tem sido a quimiocina mais extensivamente estudada no contexto de nefropatia diabética, considerada a mais potente quimiocina para recrutamento de monócitos / macrófagos no tecido renal, sendo principalmente secretada por células epiteliais glomerulares e tubulares através da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Estudos imuno-histoquímica com pacientes com nefropatia diabética revelaram que há uma alta regulação de MCP-1 nas lesões túbulo-intersticial. Esses pacientes mostram aumento gradual dos níveis urinários de MCP-1, que se correlacionam com o aumento da gravidade clínica e estágio da doença, sugerindo uma anormalidade na sinalização de *CCL2*, que tem sido relacionada com características diversas da podocitopatia que estes pacientes apresentam nesta patologia (JHA; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2014; NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011).

As citocinas pró-inflamatórias tiveram sua associação com o desenvolvimento da nefropatia diabética sugerida pela primeira vez em 1991 (HASEGAWA et al., 1991). A IL-18 é uma potente citocina pró-inflamatória que induz a produção de IFN- $\gamma$ . O gene humano *IL18* está localizado no cromossomo 11, posição 11q22.2 - q22.3, e os 5 éxons codificam uma proteína de 193 aminoácidos. Estudos sugerem que pacientes com ND apresenta uma expressão aumentada desta citocina em células tubulares renais, o que foi atribuído à ativação de mitógeno ativada da proteína quinase (MAPK) via pelo fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Estudos recentes demonstram que pacientes com nefropatia diabética tiveram elevação dos níveis séricos, bem como aumento da excreção urinária desta citocina (FUJITA et al., 2012; MIYAUCHI et al., 2009).

Considerando-se que o DM1 é uma doença autoimune e que a inflamação tem sido indicada como um fator importante para o desenvolvimento do DM1, e que as altas concentrações de glicose induzem a expressão de receptores *toll-like* e toda a cascata de sinalização dos mesmos, o presente trabalho propõe o estudo da expressão de RNAm dos *TLR2, TLR4, MYD88, NFKB, MCP1/CCL2* e *IL18* em pacientes com DM1, em comparação a indivíduos normoglicêmicos, para avaliar a contribuição dos mesmos ao estado pró-inflamatório e ao desenvolvimento da nefropatia diabética destes indivíduos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de RNAm dos genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *NFKB*, *MCP/CCL2* e *IL18* em células mononucleares do sangue periférico de crianças, adolescentes e adultos jovens com DM1 visando avaliar a associação destes genes com o estado pró-inflamatório do DM1 e alteração da função renal.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar os parâmetros biodemográficos dos indivíduos estudados;
- ❖ Determinar o controle glicêmico através da concentração de glicemia de jejum e hemoglobina glicada;
- ❖ Medir marcadores de função renal, como ureia e creatinina séricas e relação albumina/creatinina urinárias; proteína total e frações séricas; e o perfil lipídico, incluindo triglicerídeos, colesterol total e frações;
- ❖ Mensurar a expressão do RNAm dos genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *NFKB*, *MCPI/CCL2* e *IL18* em células mononucleares do sangue periférico;
- ❖ Correlacionar parâmetros bioquímicos e moleculares a fim de verificar a associação do *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *NFKB*, *MCPI/CCL2* e *IL18* com estado inflamatório e o presença da nefropatia associados ao DM1.

## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 Tipo de Estudo**

Trata-se de um estudo transversal de caráter comparativo (caso-controle, não-pareado), visando comparar alterações na expressão de RNAm dos genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *NFKB*, *MCPI/ CCL2* e *IL18* associados ao estado inflamatório do DM1, bem como a alterações na função renal, de crianças, adolescentes e adultos jovens com DM1 e normoglicêmicos (NG). Todos os indivíduos foram convidados a participar do estudo de forma aleatória.

### **3.2 Aspectos Éticos e Financeiros**

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN, obedecendo às diretrizes da resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 196/96, sob parecer substanciado nº 030319/2013. Para a realização deste estudo dentro da estrutura do Hospital de Pediatria Prof. Heriberto Bezerra/CCS/UFRN (HOSPED), o mesmo foi avaliado e aprovado pela direção do Hospital e pela Comissão de Pesquisa, sob parecer substanciado nº 04/2013 (**Anexo 1**).

Os indivíduos selecionados e/ou responsáveis foram informados sobre o protocolo de estudo e somente participaram aqueles que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Apêndice A**).

O presente trabalho recebeu financiamento através do Edital Universal CNPq 2010, processo 481402/2010-1 e Edital FAPERN/PPSUS, processo 1543.

### **3.3 Casuística**

#### **3.3.1 Grupo diabético tipo 1 – DM1**

Foram estudados 49 pacientes com diagnóstico de diabetes tipo 1 (ADA, 2014; SBD, 2014), de ambos os sexos, com idade entre 6 a 20 anos. Todos apresentavam história típica de cetoacidose diabética, hiperglicemia e faziam uso contínuo de insulina. Foram excluídos do estudo etilistas, fumantes, gestantes, e com infecções e outras doenças inflamatórias. Estes

pacientes eram acompanhados na Unidade de Endocrinologia do Hospital de Pediatria Prof. Heriberto Ferreira Bezerra/CCS/UFRN pelo Prof. Dr. Ricardo Fernando Arrais.

Todos os pacientes foram submetidos a uma triagem pelos pesquisadores, e responderam aos questionamentos da ficha de cadastro dos pacientes (**Apêndice B**). Toda avaliação clínica foi realizada na Unidade de Endocrinologia HOSPED/UFRN.

### **3.3.2 Grupo normoglicêmico – NG**

Foram selecionados 49 indivíduos, de ambos os sexos, com idade entre 6 a 20 anos, que relataram não ter o DM1, e apresentaram glicemia de jejum  $\leq 99$ mg/dL (ADA, 2014), sendo considerado grupo normoglicêmico. Estes indivíduos foram recrutados em escolas da rede pública de ensino da cidade de Natal-RN.

Assim como para o grupo DM1, todos os indivíduos normoglicêmicos foram submetidos a uma triagem pelos pesquisadores, e responderam aos questionamentos da ficha de cadastro dos pacientes (**Apêndice B**).

### **3.4 Amostras Biológicas**

Foram coletados 17mL de sangue, após jejum de 12 horas, de todos os pacientes para a determinação das concentrações de glicemia de jejum, hemoglobina glicada, ureia, creatinina, colesterol e frações, triglicerídeos e extração de RNA total. O sangue foi fracionado em 3 alíquotas, sendo uma sem anticoagulante (para a determinação dos parâmetros séricos) e dois tubos contendo EDTA (para hemoglobina glicada e avaliação genética).

Além da amostra de sangue, foi coletada amostra da primeira urina da manhã para a realização das dosagens bioquímicas de albumina e creatinina e o cálculo da relação albumina/creatinina (RAC).

### 3.5 Determinação dos Parâmetros Bioquímicos

As concentrações de glicose, ureia, creatinina, colesterol e frações, triglicerídeos foram determinadas utilizando kits LABTEST (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante, utilizando o analisador bioquímico LABMAX PLENNO (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). As dosagens destes parâmetros foram realizadas no Laboratório Integrado de Análises Toxicológicas e Clínicas – LIATEC/Natal/RN.

A determinação da concentração de hemoglobina glicada através da técnica de microcromatografia de separação rápida utilizando o kit LABTEST (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), dosagens de creatinina foram realizada também pelo o kit LABTEST, enquanto as concentrações da albumina urinárias foram realizadas a partir de kits *BioSystems Reagents and Instruments* (Barcelona, Espanha), de acordo com a metodologia descrita pelos fabricantes. Estas dosagens foram realizadas no Laboratório Multidisciplinar - LABMULT do PPgCF/UFRN, e efetuadas no espectrofotômetro semi-automatizado Bio 2000 (*Bioplus*®, São Paulo, Brasil).

### 3.6 Análise da expressão de RNAm dos genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *NFKB*, *MCPI/CCL2* e *IL18*, em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

#### 3.6.1 Extração do RNA total de sangue periférico

O RNA total foi obtido a partir de células mononucleares de sangue periférico, previamente separado por gradiente descontínuo de *Ficoll-Hypaque* (*Sigma-Aldrich*, MO, EUA), com densidade específica de 1,070g/mL, à temperatura ambiente. A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit *Illustra Triple Prep*® (*GE Healthcare*, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido), imediatamente após a separação das células mononucleares. O material obtido foi armazenado no freezer -80°C até a sua análise.

A integridade do RNA total extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo formaldeído a 37% e tampão MOPS [MOPS a 20mM (pH 7,0), acetato de sódio a 8mM e EDTA a 1mM (pH 8,0), preparado com água tratada com DEPC], e posteriormente, corado com *gel Red* (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Em seguida, o gel de agarose foi

fotodocumentado em sistema de captura de imagem *Gel Logic 100 Imaging System* (Carestream Health Inc., Rochester, NY, EUA), utilizando o programa *Molecular Imaging* (KODAK, Rochester, NY, EUA). Todos esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular - LABIOMOL do PPgCF/UFRN. O RNA total extraído foi quantificado e avaliado o grau de pureza através do Fluorômetro Qubit® 2.0 (Foster City, CA, EUA).

### 3.6.2 Obtenção do cDNA

A síntese do cDNA a partir do RNA total foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular - LABIOMOL utilizando-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* fornecido pela *Applied Biosystems*® (Foster City, CA, EUA), de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante em termociclador *MyCycler*<sup>TM</sup> (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

### 3.6.3 Seleção do gene de referência

Os cDNAs dos genes *18S* (número genbank de acesso NM\_003286.2), *ubiquitina C* (*UBC* número genbank de acesso NM\_021009.4), *β-actina* (número genbank de acesso NM\_001101.3) e *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* (*GAPDH*, número genbank de acesso NM\_002046.3) foram amplificados pela PCR em tempo real, no aparelho ABI 7500 *fast* (*Applied Biosystem*, Foster City, CA, EUA), no Laboratório de Biologia Molecular. Para a amplificação, pela PCR em tempo real dos genes de referência testados, foram utilizados iniciadores e sondas, marcadas com fluoróforos, selecionados com o auxílio do programa *Primer Express*® (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) com base nas sequências gênicas disponíveis no banco de dados do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Para a padronização do gene de referência, os iniciadores foram sintetizados pela IDT Prodimol (*Integrated DNA Technologies*, Coralville, IA, EUA) e as sondas pela *Applied Biosystems* (Foster City, CA, EUA), de acordo com as sequências descritas na **TABELA 1**.

**TABELA 1** – Iniciadores e sondas utilizados para a seleção do gene de referência.

<b>GENES</b>	<b>INICIADORES</b>	<b>FRAGMENTOS</b>
	5' GGCGTCCCCCAACTTCTTA 3'	
<b><i>18S</i></b>	5' GGGCATCACAGACCTGTTATTG 3'	76 pb
	5' FAMTGGCGTTCAGCCACCCGAGATTTAMRA 3'	
	5' ATTTGGGTCGCAGTTCTTG 3'	
<b><i>UBC</i></b>	5' TGCCTTGACATTCTCGATGGT 3'	133 pb
	5' FAMGTGATCGTCACTTGACAATAMRA3'	
	5' TGGCACCACACCTTCTACAATG 3'	
<b><i><math>\beta</math>-actina</i></b>	5' TCTCAAACATGATCTGGGTCATCT 3'	121 pb
	5' FAMCACCCCGTGCTGCTGACCGATAMRA 3'	
	5' GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA 3'	
<b><i>GAPDH</i></b>	5' CTGGAAGATGGTGATGGGATTTC 3'	229 pb
	5' VICCATGGCACCGTCAAGGCTGAGAACGTAMRA3'	

As condições de PCR foram ajustadas em laboratório. Em seguida, foram selecionados aleatoriamente 5 indivíduos por grupo (NG e DM1) para a determinação da expressão gênica. Posteriormente, os valores de ciclo *threshold* (Ct) obtidos foram testados com o auxílio da ferramenta NormFinder (MDL, Aarhus, Dinamarca) para demonstrar o valor de estabilidade e pelo programa Genorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) para avaliar o valor de M, e assim, estabelecer o melhor gene de referência para a população de estudo. O gene da  $\beta$ -

*actina* foi selecionado por ambos os programas, como o melhor gene de referência para a população estudada, pois este gene apresentou valores de estabilidade e de M próximos à zero, indicando menor variação de Ct e, conseqüentemente, maior estabilidade (**TABELA 2**).

**TABELA 2** - Estabilidade dos genes de referência testados na população de estudo, utilizando o NormFinder e o programa Genorm.

<b>GENE</b>	<b>VALOR DE ESTABILIDADE (NORMFINDER)</b>	<b>VALOR DE M (GENORM)</b>
<i><b><math>\beta</math>-actina</b></i>	<b>0,354</b>	<b>0,156</b>
<i>18S</i>	0,497	0,272
<i>GAPDH</i>	1,042	0,183
<i>UBC</i>	1,808	0,179

### **3.6.4 Análise da expressão de RNAm dos genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *MCPI/CCL2* e *IL18* pela PCR em Tempo Real**

Os cDNAs dos genes de estudo foram amplificados pela PCR em tempo real, no aparelho ABI 7500 fast (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA). Para a amplificação pela PCR em tempo real foram selecionados os iniciadores e as sondas dos genes alvo com o auxílio do programa Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com base nas sequências gênicas disponíveis no banco de dados do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), com exceção dos genes *NFKB*, *MCPI/CCL2* e *IL18*, que tiveram sua expressão gênica avaliada utilizando ensaios prontos da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). Os iniciadores e sondas, marcadas com fluoróforo, selecionados pelos pesquisadores estão descritos na **TABELA 3** e os ensaios prontos na **TABELA 4**.

**TABELA 3** – Iniciadores e sonda utilizados para a avaliação da expressão dos genes *TLR2*, *TLR4* e *MYD88*.

<b>GENES</b>	<b>INICIADORES</b>	<b>FRAGMENTOS</b>
<b><i>TLR2</i></b>	5' CCCTGGGCAGTCTTGAACATT 3'	128 pb
	5' CCCTAGGGTTTTGTAAAGATTTC 3'	
	5' FAMTTTATCGTCTTCCTGGTTCAAGCCCCTTC TAMRA3'	
<b><i>TLR4</i></b>	5' AGCGAGCCACGCATTCAC 3'	107 pb
	5' GCCATGGCTGGGATCAGA 3'	
	5' FAM ATGTCTGCCTCGCGCCTGGC TAMRA 3'	
<b><i>MYD88</i></b>	5' AAGGAATGTGACTTCCAGACCAA 3'	128 pb
	5' ACAGTGATGAACCTCAGGATGCT 3'	
	5' FAMCTCTCCAGGTGCCCATCAGAAGCGTAMRA3'	

**TABELA 4** – Características dos ensaios prontos para os genes *NFKB*, *MCPI/CCL2* e *IL18* utilizados em suas análises de expressão gênica.

<b>GENE</b>	<b>CÓDIGO DO ENSAIO</b>
<b><i>NFKB</i></b>	Hs00765730_m1
<b><i>MCPI/CCL2</i></b>	Hs00234140_m1
<b><i>IL18</i></b>	Hs01038788_m1

As condições da PCR foram ajustadas no Laboratório de Biologia Molecular, onde foram realizadas as amplificações, em duplicata, a partir de 10ng de cDNA, para cada um dos genes de estudo e do gene constitutivo, utilizando amplificação por PCR em tempo real quantitativa, no aparelho ABI 7500 *fast* (*Applied Biosystem*, Foster City, CA, EUA). As Condições da PCR em tempo real foram os seguintes: 20 min a 95 ° C, seguido por 40 ciclos que consistem de 3 seg a 95 ° C, e 30 seg a 60 ° C.

A quantificação relativa dos genes em estudo foi calculada pelo método comparativo Ct usando a fórmula do  $2^{-\Delta\Delta C_{t\text{média}}}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

## 4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

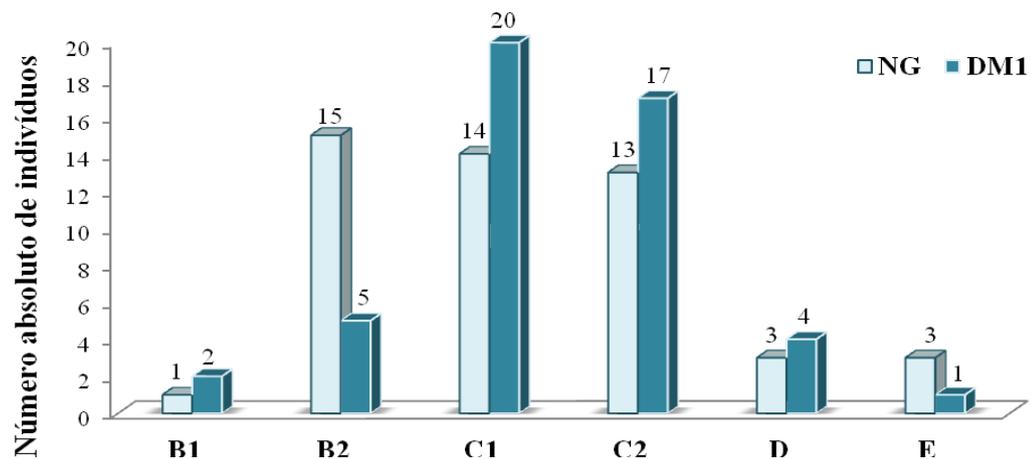
Inicialmente, foi realizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis contínuas. As variáveis com distribuição paramétrica foram submetidas ao teste T de *Student* ou ANOVA *One way*, seguida pelo pós-teste de *Tukey* e também realizada correlação de *Pearson*. Aquelas variáveis que foram consideradas não-paramétricas foram analisadas pelos testes de *Mann-Whitney* ou *Kruskall-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn* e, ainda, efetuado a correlação de *Spearman*. Para variável categórica sexo foi utilizado o teste qui-quadrado. Os programas utilizados nestas avaliações foram o SPSS versão 15.0 (*SPSS Inc.*, Chicago, IL, EUA) e o GRAPHPAD PRISM, versão 5.0 (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, CA, EUA).

Para todas as análises estatísticas realizadas, foram considerados estatisticamente significativos os resultados cujos níveis descritivos (valores de p) foram inferiores a 0,05.

## 5 RESULTADOS

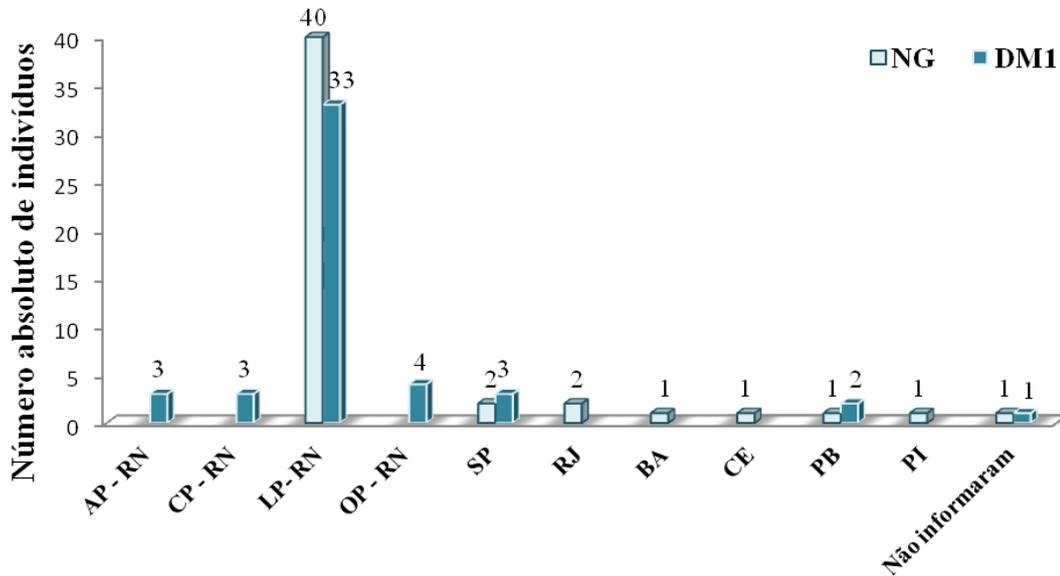
### 5.1 Caracterização da população de estudo

A população de estudo incluiu 49 pacientes com diagnóstico clínico de DM1 e 49 indivíduos normoglicêmicos de ambos os sexos, na faixa etária de 6 a 20 anos e pertencentes às mesmas classes socioeconômicas. De acordo com a **FIGURA 4**, que representa a distribuição dos indivíduos de acordo com a classificação socioeconômica, observou-se a homogeneidade dos grupos em relação à situação socioeconômica, onde os sujeitos estudados pertenciam principalmente à classe socioeconômica C1 (35%), seguida pelas classes C2 (31%) e B2 (21%) (Associação de Empresas de Pesquisas – ABEP, 2013 – **ANEXO 2**).



**FIGURA 4** - Distribuição dos indivíduos estudados de acordo com classificação socioeconômica e os grupos de estudo. **NG**, grupo normoglicêmico; **DM1**, grupo diabético tipo 1.

Em relação à naturalidade dos indivíduos estudados, observou-se que a maioria é proveniente da mesorregião Leste Potiguar do Rio Grande do Norte, que compreende, entre outros, os municípios da Grande Natal (Natal, Ceará-mirim, Extremoz, Macaíba, Monte Alegre, Nísia Floresta, Parnamirim, São Gonçalo do Amarante, São José de Mipibu e Vera Cruz) (**FIGURA 5**).



**FIGURA 5** - Distribuição dos indivíduos estudados de acordo com a naturalidade. **NG**, grupo normoglicêmico; **DM1**, grupo diabético tipo 1. **AP-RN** (mesorregião Agreste Potiguar – Rio grande do Norte); **CP-RN** (mesorregião Central Potiguar – Rio grande do Norte); **LP-RN** (mesorregião Leste Potiguar – Rio grande do Norte); **OP-RN** (mesorregião Oeste Potiguar – Rio grande do Norte); **SP** (São Paulo); **RJ** (Rio de Janeiro); **BA** (Bahia); **CE** (Ceará); **PB** (Paraíba); **PI** (Piauí).

Os pacientes diabéticos foram avaliados em sua totalidade (grupo **DM1**), e subdivididos em dois grupos, utilizando como critério o controle glicêmico: diabéticos compensados (grupo **DM1C**), incluindo aqueles indivíduos com hemoglobina glicada  $\leq 8\%$ ; e diabéticos não compensados (grupo **DM1NC**), compreendendo aqueles com valores de hemoglobina glicada  $> 8\%$ .

Este valor foi adotado de acordo com as metas propostas pela Associação Americana de Diabetes (ADA, do inglês *American Diabetes Association*) (2014) e Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (2013) para a manutenção de um controle glicêmico satisfatório, prevenindo assim, o desenvolvimento de complicações futuras. Estas metas são estabelecidas de acordo com a faixa etária, sendo  $\leq 8\%$  para crianças; e,  $< 7,5\%$  para adolescentes e adultos jovens (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). Ao realizar a subdivisão do grupo diabético, observou-se que 65,3% (32/49) dos pacientes apresentaram valores de hemoglobina glicada superiores a 8% (**TABELA 5**).

**TABELA 5** - Características demográficas dos grupos estudados.

	<b>NG</b>	<b>DM1</b>		<b>DM1C</b>	<b>DM1NC</b>			
	<b>n=49</b>	<b>n=49</b>	<b>p-valor1</b>	<b>n=17</b>	<b>n=32</b>	<b>p-valor2</b>	<b>p-valor3</b>	<b>p-valor4</b>
<b>Sexo, Feminino, %</b>	47,2	52,8	0,543	17	35,8	0,990	0,747	0,905
<b>Idade, anos</b>	11,6 ±3,9	12,4 ±4,1	0,300	11,6 ±4,2	12,9 ±4,1	1	0,339	0,543
<b>Idade ao diagnóstico, anos</b>	-	6,6 ±3,6	-	6,8 ±3,0	6,5 ±3,9	-	-	0,770
<b>Tempo de diagnóstico, anos</b>	-	5,7 ±4,2	-	4,8 ±4,2	6,3 ±4,2	-	-	0,239

Os resultados foram expressos em média ± desvio para as variáveis, exceto onde diferentemente indicado. p-valor1: NG X DM1; p-valor2: DM1C X NG; p-valor3: DM1NC X NG; p-valor4: DM1C X DM1NC. n, número de indivíduos; NG, grupo normoglicêmico; DM1, grupo diabético tipo 1; DM1C, grupo diabético compensado; DM1NC, grupo diabético não compensado.

Os grupos em estudo apresentaram-se homogêneos em relação ao sexo e a idade, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas. Em relação, a idade ao diagnóstico e o tempo de diagnóstico, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos DM1C e DM1NC ( $p = 0,770$  e  $p = 0,239$ , respectivamente).

## 5.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

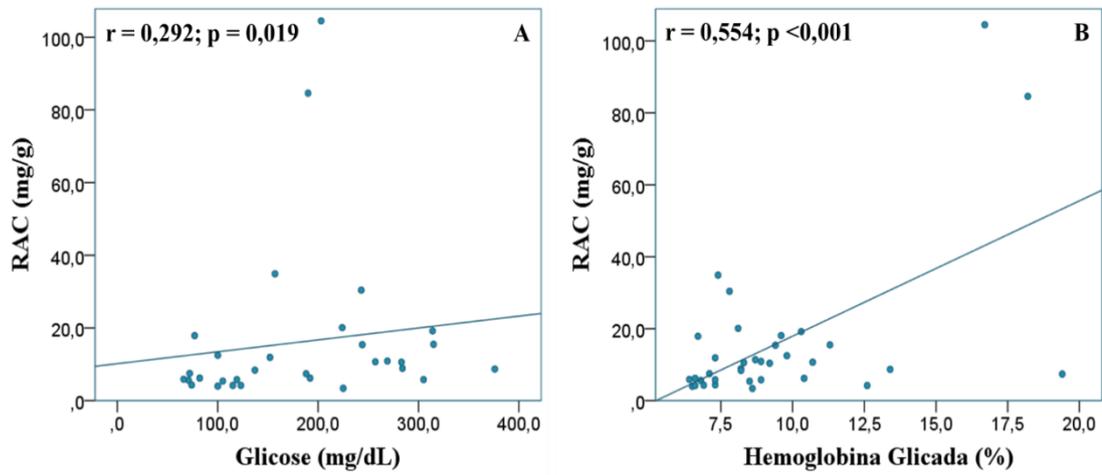
Os resultados referentes aos parâmetros de controle glicêmico, perfil lipídico e marcadores da função renal estão descritos na **TABELA 6**. Como esperado, os grupos DM1, DM1C e DM1NC apresentaram um aumento estatisticamente significativo nos valores de glicose e hemoglobina glicada em relação ao grupo NG ( $p < 0,001$ ), assim como, observou-se um aumento nestes parâmetros no grupo DM1NC quando comparado ao DM1C ( $p < 0,001$ ).

Avaliando marcadores da função renal, observou-se que as concentrações de ureia e creatinina sérica não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos; e a RAC mostrou-se significativamente elevada no grupo DM ( $p = 0,006$ ) e subgrupo DM1NC ( $p = 0,008$ ) em relação ao NG. Dos 49 indivíduos diabéticos estudados, 4 apresentaram albuminúria (RAC entre 30-299  $\mu\text{g}/\text{mg}$  creatinina), resultando em uma prevalência de 8,2%. Ainda em se tratando desses pacientes, observou-se uma média de idade de 14,5 anos, tempo de diagnóstico de 6,8 anos e idade ao diagnóstico em torno de 7,3 anos. Além disso, os 4 pacientes exibiram um controle glicêmico insatisfatório (hemoglobina glicada  $>8\%$ ) e uma concentração média de 4,3g/dL de globulinas.

Em relação, às concentrações séricas das proteínas totais foi observado um aumento significativo nos indivíduos diabéticos ( $p = 0,044$ ), em relação ao grupo normoglicêmico. Entretanto ao avaliar as frações proteicas séricas, observou-se que nas concentrações de albumina não foi evidenciado diferença estatística para grupo diabético em relação ao normoglicêmico. Porém, ao avaliar as globulinas observou um aumento significativo no grupo DM e nos subgrupos DMC ( $p < 0,001$ ) e DMNC ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo normoglicêmico.

Quanto ao perfil lipídico, colesterol total e frações e triglicerídeos não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos e subgrupos estudados, onde todos apresentaram concentração colesterol e triglicerídeos dentro dos valores de referência (ANEXO 3).

Análises de correlação entre a RAC e os parâmetros de controle glicêmicos, glicose e hemoglobina glicada, mostraram uma significativa correlação positiva, tanto ao relacionar os valores RAC com as concentrações glicose sérica e RAC com valores hemoglobina glicada.



**FIGURA 6** - Correlações entre RAC e controle glicêmico no grupo diabético total. **A:** RAC x Glicose; **B:** RAC x Hemoglobina Glicada.

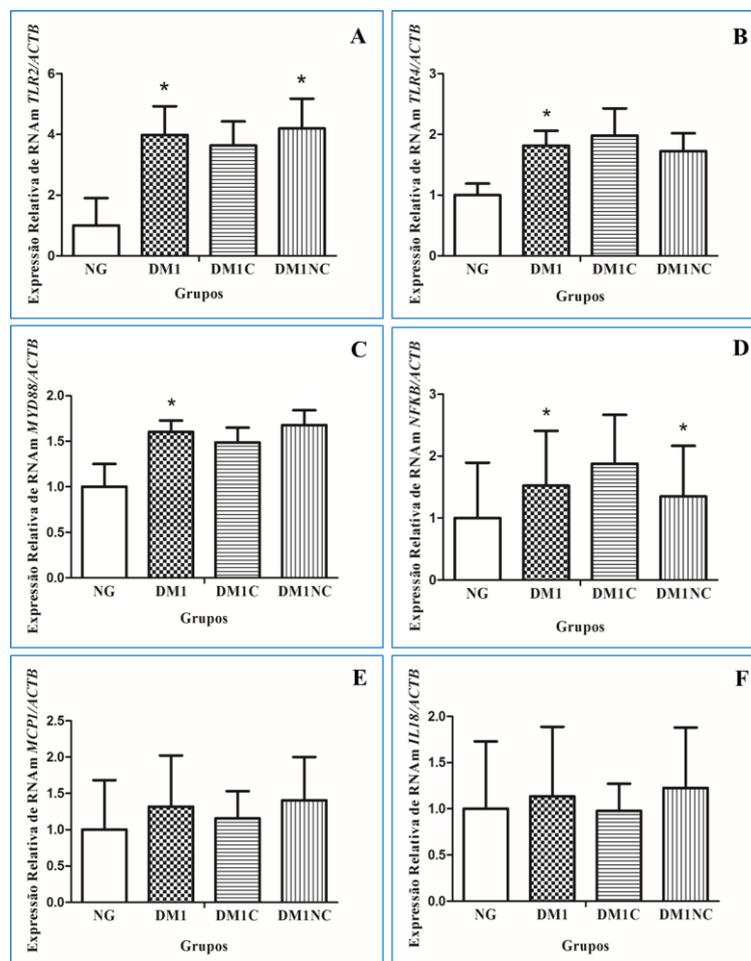
TABELA 6 – Parâmetros bioquímicos avaliados de acordo com os grupos de estudo.

	NG n=49	DM1 n=49	p-valor1	DM1C n=17	DM1NC n=32	p-valor2	p-valor3	p-valor4
<b>Glicose, mg/dL</b>	80,0 (71,0-89,0)	192,0 (119,0-255,0)	<b>&lt;0,001</b>	117,0 (74,0-157,0)	216,0 (179,0-268,0)	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Hb glicada, %</b>	5,6 (5,2 -5,9)	8,6 (7,3-10,4)	<b>&lt;0,001</b>	7,1 (6,7-7,3)	9,7 (8,6 -11,2)	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Colesterol total, mg/dL</b>	176,7 ±36,8	167,9 ±38,9	0,268	165,7 ±31,3	168,9 ±42,5	0,607	0,660	0,963
<b>LDL-c, mg/dL</b>	110 ±35,3	99,9 ±35,8	0,180	98,2 ±30,5	100,8 ±38,5	0,520	0,519	0,971
<b>HDL-c, mg/dL</b>	43,6 ±7,0	46,1 ±7,7	0,100	47,6 ±8,2	45,4 ±7,4	0,169	0,543	0,622
<b>VLDL-c, mg/dL</b>	19,4 (18,2-26,8)	18,6 (16,6 -21,0)	0,187	17,8 (16,4-19,0)	19,6 (17,0- 25,8)	0,552	0,985	0,672
<b>Triglicerídeos, mg/dL</b>	97,0 (91,0-134,0)	96,0 (84,0-120,0)	0,385	89,0 (82,0 -97,0)	100,0 (86,0- 140,0)	0,652	0,875	0,470
<b>Ureia, mg/dL</b>	27,4 ±8,8	25,7 ±8,1	0,386	28,1 ±7,2	24,5 ±8,3	0,935	0,358	0,390
<b>CREA, mg/dL</b>	0,7 (0,6-0,8)	0,7 (0,6-0,8)	0,641	0,7 (0,6-0,8)	0,7 (0,6-0,8)	0,973	0,849	0,981
<b>RAC, µg/mg</b>	5,0 (4,4-8,6)	8,9 (5,8-15,5)	<b>0,006</b>	5,9 (4,4-11,9)	10,6 (7,4-15,5)	0,832	<b>0,008</b>	0,391
<b>Albumina, mg/dL</b>	4,0 (3,6-4,2)	4,0 (3,5-4,3)	0,984	3,5 (3,5- 4,0)	4,1 (3,6 – 4,3)	0,757	0,760	0,987
<b>Proteínas Totais, mg/dL</b>	7,0 (6,5-7,9)	7,8 (6,8-8,3)	<b>0,044</b>	7,9 (7,2 - 8,4)	7,8 (6,8 -8,2)	0,811	0,697	1,000
<b>Globulinas, mg/dL</b>	3,0 (2,7 -3,4)	3,7 (3,2 -4,2)	<b>&lt;0,001</b>	3,8 (3,5 – 4,6)	3,6 (2,8- 3,9)	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,739

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil). Valores de p significativos estão apresentados em negrito. **p-valor1**: NG X DM1. **p-valor2**: DM1C X NG; **p-valor3**: DM1NC X NG; **p-valor4**: DM1C X DM1NC. **n**, número de indivíduos. **NG**, grupo normoglicêmico; **DM1**, grupo diabético tipo 1; **DM1C**, grupo diabético compensado; **DM1NC**, grupo diabético não compensado; **Hb glicada**, hemoglobina glicada; **CREA**, creatinina; **RAC**, relação albumina-creatinina.

### 5.3 Avaliação da expressão dos genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *NFKB*, *MCPI/CCL2* e *IL18*

Na análise da expressão de RNAm para os genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *NFKB*, *MCPI/CCL2* e *IL18* em PBMCs (**FIGURA 7**), observou-se um aumento significativa na expressão do *TLR2* ( $p = 0,003$ ), *TLR4* ( $p = 0,006$ ), *MYD88* ( $p = 0,015$ ), *NFKB* ( $p = 0,035$ ) para o grupo DM1 em relação ao NG. Também foi observada uma expressão significativamente aumentada de *TLR2* ( $p = 0,017$ ) e *NFKB* ( $p = 0,035$ ) para o grupo DM1NC em relação ao NG. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de *MCPI/CCL2* e *IL18* entre os grupos e subgrupos.



**FIGURA 7** - Expressão de RNAm em PBMCs dos genes *TLR2* (A), *TLR4* (B), *MYD88* (C), *NFKB* (D), *MCPI/CCL2* (E) e *IL18* (F), normalizados pela  $\beta$ -actina, nos grupos estudados. As barras representam a média do número de vezes (*fold change*) da expressão de RNAm nos grupos diabéticos em comparação a média da expressão de RNAm do grupo normoglicêmico (média  $\pm$  erro padrão). \* Significativo em relação ao NG ( $p < 0,05$ ).

Ao avaliar os pacientes que apresentaram albuminúria verificou-se o aumento de 43 vezes na expressão *MCPI/CCL2* e de 30 vezes *IL18* em relação aos outros pacientes diabéticos.

Observaram-se, ainda, correlações significativas positivas entre a expressão de *TLR2* e *NFKB* ( $r = 0,555$ ,  $p = 0,001$ ); *TLR4* e *MYD88* ( $r = 0,499$ ,  $p = 0,001$ ); *TLR2* e *IL18* ( $r = 0,626$ ,  $p = 0,001$ ); e *MCPI/CCL2* e *IL18* ( $r = 0,468$ ,  $p = 0,001$ ).

## 6 DISCUSSÃO

As complicações crônicas são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade de pacientes com DM1. A exposição prolongada dos à hiperglicemia é a principal responsável pelas alterações micro e macrovasculares associadas ao DM1, levando à disfunção, dano ou falência de vários órgãos (PASQUALOTTO, 2012). Outros fatores de risco para o desenvolvimento de complicações são a idade ao diagnóstico e o tempo da doença (HAMANN et al., 2012; HOFBAUER et al., 2007; VESTERGAARD; REJNMARK; MOSEKILDE, 2009). Para prevenir e/ou retardar o surgimento dessas complicações a Sociedade Internacional de Diabetes Infantil e Adolescente (ISPAD) e a Fundação Internacional de Diabetes (IDF) recomendam que a avaliação anual para pesquisa de complicações microvasculares deve ser iniciada a partir de 11 anos de idade e depois de dois anos de duração do diabetes (IDF, 2013).

No presente estudo a média de idade ao diagnóstico variou de 6,5 a 6,8 anos nos grupos diabéticos, o que mostra que estes pacientes estão ainda na fase pré-pubere. Estudos demonstram que quanto mais cedo os indivíduos desenvolvem o diabetes, maior será o tempo de exposição ao quadro de hiperglicemia crônica, aumentando assim a probabilidade do desenvolvimento de complicações futuras. Porém, se a instalação deste distúrbio metabólico ocorrer no período da puberdade, o desenvolvimento destas alterações pode ser acelerado devido a alterações hormonais e psicológicas (MÖLLSTEN et al., 2009; TIMÓTEO et al., 2012). Pelo fato das complicações diabéticas raramente estarem presentes antes da puberdade, durante muito tempo se pensou que o diagnóstico do diabetes nessa fase tivesse melhor impacto quanto ao desenvolvimento das complicações, porém achados de albuminúria e retinopatia em crianças pré-púberes tem mudado essa visão, mostrando que nesta fase podem desenvolver complicações microvasculares (AL-AGHA; OCHELTREE; HAKEEM, 2013; BOGDANOVIĆ, 2008).

Um outro fator de risco para o desenvolvimento de complicações e também avaliado no presente estudo, foi o tempo de diagnóstico (em média 5,7 anos), que evidenciou a susceptibilidade destes indivíduos ao desenvolvimento de complicações. De uma maneira geral, essas complicações comumente aparecem após dez anos de doença, porém estudos mais recentes têm demonstrado que alterações patológicas ocorrem logo após o diagnóstico, e os sinais clínicos precoces destas alterações são detectáveis após 2-5 anos de duração da doença (BOGDANOVIĆ, 2008; CHO et al., 2011).

Vários estudos clínicos demonstraram que o controle glicêmico intensivo em pacientes com diabetes pode reduzir a incidência e progressão de nefropatia diabética e também pode reduzir a incidência de outras complicações (MARCOVECCHIO et al., 2014; THOMAS, 2014).

Os resultados encontrados neste trabalho demonstram que os pacientes apresentaram um controle glicêmico insatisfatório que se deve tanto aos fatores próprios da idade, como a dificuldade de aceitar a doença, comprometendo a adesão ao tratamento, sensibilidade prejudicada a insulina devido as flutuações hormonais durante a puberdade, a incapacidade de promover o auto-cuidado, e o maior risco de episódios de hipoglicemia, especialmente em crianças menores de seis anos, que pode levar a sequelas neurológicas e até morte (ADA, 2014). Resultados semelhantes são relatados na literatura em estudos com crianças e adolescentes com DM1. Galler et al. (2011), avaliando indivíduos diabéticos tipo 1 com média de idade entre 13,7 anos; Ingerski et al. (2010) estudando indivíduos com DM1 com idade entre 13-18 anos e Ururahy et al. (2012) estudando pacientes com DM1 com média de idade de 12,2 anos, relataram a dificuldade em obter um bom controle glicêmico nessa faixa etária, evidenciada pelos altos valores de hemoglobina glicada.

Além disso, nesses pacientes observou-se por meio de entrevistas para questionário e através do levantamento de prontuários (dados não mostrados) que outros fatores que podem estar relacionados com esse controle glicêmico alterado. Dentre os fatores sócio-econômicos estão a dificuldade em se conseguir acompanhamento de uma equipe de saúde especializada na região onde esses indivíduos residem – uma vez que a maioria desses pacientes mora no interior do estado, a dificuldade de acesso a uma dieta adequada e falhas no tratamento devido à falta de recursos financeiros para adquirir os medicamentos e aparelhos de automonitorização – essenciais para acompanhar as flutuações diárias de glicose e assim possibilitar o ajuste das doses de insulina.

O controle glicêmico é o principal fator envolvido no desenvolvimento e severidade das complicações do DM1. A relação causal ente hiperglicemia crônica e o desenvolvimento de complicações microvasculares foi estabelecida pelos dados provenientes do *Diabetes Control Trial* (DCCT) que constatou que uma melhora no controle glicêmico, obtida através de uma terapia intensiva, reduzia os riscos de desenvolver complicações. Nesse estudo, o subgrupo de 13 a 17 anos que recebeu tratamento intensivo apresentou uma redução na

hemoglobina A1c de aproximadamente 2% e uma redução de 10% na incidência de albuminúria (DCCT, 1993).

Desta forma, os pacientes desse estudo são fortes candidatos a desenvolver complicações precocemente, devido às condições previamente discutidas. Estudos demonstram que um bom controle metabólico durante a adolescência tem o potencial de reverter complicações precoces do DM1, tais como alterações renais, ósseas, neuropáticas e gastrointestinais, e podem auxiliar na prevenção da nefropatia, retinopatia e osteopenia diabéticas (ANDERSON; MCKAY, 2011). Assim, é de extrema importância que todos os esforços sejam concentrados em alcançar o controle glicêmico adequado, especialmente nos primeiros anos após o diagnóstico de diabetes. Sendo assim, é importante a mudança no estilo e na qualidade de vida desses pacientes, a implementando orientações ao tratamento e protocolos de monitoramento normalizados para garantir melhores cuidados de saúde para crianças e adolescentes com diabetes, assim melhorando a sua qualidade de vida futura e evitando complicações agudas e crônicas.

Como triagem para complicações crônicas, a ADA (2014) recomenda a realização anual da pesquisa de microalbuminúria em pacientes com dez anos de idade ou cinco anos de diagnóstico, a fim de identificar alterações precoces da função renal. No presente estudo, os valores aumentados de RAC no grupo DM1 e no subgrupo DMNC em relação ao NG sugerem a instalação de um quadro inicial de alteração renal nestes pacientes. Dados semelhantes foram relatados por Hernandez-Marco et al. (2009) estudando crianças e adolescentes com DM1 com média de idade de 13,9 anos e tempo de diagnóstico de 4,9 anos, no mesmo estudo foi observado a presença de hiperfiltração e albuminúria. Um aumento da RAC em crianças e adolescentes com DM1 também foi encontrado por Ururahy et al. (2012) estudando crianças e adolescentes com a média de idade de 11,9 anos.

Dos 49 indivíduos diabéticos estudados, 4 apresentaram albuminúria resultando numa prevalência de 8,2%. Observou-se que todos os indivíduos diabéticos que desenvolveram microalbuminúria apresentaram controle glicêmico insatisfatório e tempo médio de diagnóstico de 6,8 anos. Dados de prevalência de albuminúria em crianças e adolescentes são variáveis na literatura. Al-Agha et al. (2013) mostraram uma prevalência de 11,3% em pacientes com DM1 com média de 3,6 anos de diagnóstico, já Demirel et al. (2013) relata uma prevalência de 16,1% após 5-10 anos de diagnóstico. Essa variação na prevalência de albuminúria deve-se ao fato de que diversos fatores de risco podem influenciar seu

aparecimento, dentre eles o controle glicêmico, a duração da doença, a idade ao diagnóstico, a influência da puberdade, a presença de dislipidemias, a hipertensão e os fatores genéticos e familiares (BOGDANOVIĆ, 2008; LEWIS; MAXWELL, 2014).

Além disso, foi possível observar a influência do controle glicêmico nos valores da RAC através das análises de correlação. Resultados semelhantes foram demonstrados por Ururahy et al. (2012) e Marcovecchio et al. (2013). Estes dados ressaltam a importância de uma terapêutica mais rígida para alcance de controle glicêmico adequado com objetivo de prevenir e retardar do desenvolvimento da nefropatia diabética (DEMIREL et al., 2013; MARCOVECCHIO et al., 2014).

O DM1 é um estado pró-inflamatório caracterizado pelo aumento da atividade de monócitos e das concentrações circulantes de marcadores inflamatórios. A inflamação no DM1 está relacionada pela destruição das células beta-pancreáticas resultando na deficiência absoluta da secreção insulina, caracterizando o quadro de hiperglicemia. Essa hiperglicemia crônica causa danos a diversos órgãos ou tecidos que, em longo prazo, podem levar à disfunção dos mesmos (DEVARAJ et al., 2011).

O aumento da concentração globulina sérica no grupo DM1 e subgrupos é um indicativo do processo inflamatório presente nestes pacientes, visto que nesta fração proteica se encontram as imunoglobulinas (MARRON et al., 2012). Dentre das globulinas, a alfa 1 glicoproteína ácida ( $\alpha$ 1-GPA) pode estar aumentada nos pacientes diabéticos como um marcador da inflamação devido ao envolvimento na regulação da resposta imune (PICCIRILLO et al., 2004). Estudos demonstram que os marcadores de inflamação, como  $\alpha$ 1-GPA estão associados com status de nefropatia e espessamento da membrana basal glomerular, sugerindo um papel da inflamação na patogênese da nefropatia diabética (LAGRANHA; FIORINO, 2007).

A maioria dos pacientes diabéticos deste estudo apresentou o controle glicêmico insatisfatório e sabe-se que níveis elevados de glicose podem induzir a glicação de várias proteínas estruturais e funcionais, contribuindo para ativação de vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento e progressão de complicações, dentre elas a dos receptores *toll-like* (DEVARAJ et al., 2011; SINGH et al., 2014).

A ativação desta via de receptores pode ser evidenciada pelas expressões de RNAm dos genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88* e *NFKB* no presente trabalho foram aumentadas nos indivíduos

diabéticos quando comparados aos normoglicêmicos, além da correlação positiva observada para as expressões de *TLR2* e *NFKB* ( $r = 0,555$  e  $p = 0,001$ ) e *TLR4* e *MyD88* ( $r = 0,499$  e  $p = 0,001$ ). Com este resultado, pode-se sugerir que aumento da expressão de *TLR2* e *TLR4* no grupo diabético poderia estar associado à hiperglicemia e aos *AGEs* que têm sido indicados como ligantes endógenos e estariam sendo reconhecidos pelos TLR-2 e TLR-4 na superfície da célula. Uma vez ativados os TLR-2 e TLR-4 estimulariam a sinalização de forma MyD88-dependente, ativando, assim, a formação de complexo IRAK1 - IRAK4 - TRAF6, resultando na ativação de MAPK para translocação nuclear do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e culminando na produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias.

Resultados prévios deste grupo de pesquisa corroboram esta hipótese, uma vez que foi demonstrado o aumento da expressão RNAm *TLR2*, *MYD88*, *IL1 $\beta$* , *IL6* e *TNFA* em grupo de pacientes DM1 associado com aumento da RAC quando comparado ao grupo NG (URURAHY et al., 2012). No entanto, no estudo anterior, não houve diferença na expressão TLR-4, enquanto no presente estudo foi observado um aumento da expressão. Resultados semelhantes são encontrados na literatura, onde Devaraj et al. (2011) verificaram o aumento da expressão de *TLR4*, bem como, *TLR2* e *NFKB* em cultura monócitos de DM1 em comparação normoglicêmica. Porém a população de estudo era adulta, neste estudo foram crianças e adolescentes. Dados na literatura demonstram o aumento da expressão de *TLR2* e *TLR4* em glomérulos e túbulos intersticiais, associado ao aumento da expressão *MYD88*, *NFKB* e *MCPI/CCL2* e infiltração de macrófagos, reforçando assim o envolvimento do processo inflamatório mediado por receptores *toll-like* e nefropatia (LIN; TANG, 2014).

Apesar de não ter sido observado diferença significativa na expressão do RNAm de *MCPI/CCL2* e *IL18* nos grupos DM1, ao avaliar os pacientes que apresentaram microalbuminúria verificou-se o aumento de 43 vezes na expressão *MCPI/CCL2* e de 30 vezes *IL18* em relação aos outros pacientes diabéticos. Este dado pode ser justificado pelo controle glicêmico inadequado devido uma hiperglicemia crônica, distúrbios metabólicos, alterações celulares e teciduais que culmina na exacerbação do processo inflamatório induzindo o recrutamento de macrófagos no tecido renal e a produção MCP-1 nas células mesangiais (LIM; TESCH, 2012; TESCH, 2008). A correlação significativa positiva encontrada entre *TLR2* e *MCPI/CCL2* sugere que o aumento MCP-1/CCL2 pode ter sido desencadeado via cascata TLR-2. Dados na literatura demonstram o papel chave do recrutamento de monócitos/macrófagos nos modelos animais bem como em biópsias renais de pacientes com diabetes tipo 1 e 2 (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011; TESCH, 2008).

Elmarakby et al (2012), relataram aumento significativo do estresse oxidativo via hiperglicemia e da expressão de *MCPI/CCL2* em monócitos circulantes de pacientes diabéticos tipo 1 com albuminúria quando comparados com indivíduos saudáveis.

Já em relação a IL-18, estudos demonstram o aumento da expressão de IL-18 em células tubulares renais humanas, atribuído à ativação de MAPK pelo fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) bem como a ativação do *NFKB* e a ligação deste gene com a região promotora de outros genes como *MCPI/CCL2*, induzindo assim a proliferação e ativação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-18 (MIYAUCHI et al., 2009; NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011).

Considerando que foi encontrado um aumento na expressão do *TLR2*, *TLR4*, *MYD88* e *NFKB* para indivíduos diabéticos em relação aos normoglicêmicos podemos sugerir que a hiperglicemia desencadeou um estado inflamatório, possivelmente mediado pelos TLR-2 e TLR-4 nesses pacientes. Além disso, o aumento da concentração sérica das globulinas sugere um quadro inflamatório crônico associado ao aumento da relação albumina/creatinina urinárias dos pacientes com DM1 o que suportaria o aparecimento de um quadro inicial de comprometimento renal. Desta forma, este estudo apresentou indicativos importantes para justificar a necessidade de prevenção precoce da nefropatia diabética em pacientes jovens em fase pré-pubere, sendo de fundamental importância o incentivo aos pacientes no sentido de manter o controle glicêmico em níveis satisfatórios.

## 7 CONCLUSÕES

- ❖ O controle glicêmico insatisfatório dos pacientes com DM1, associado com outros fatores de risco como idade ao diagnóstico e tempo de diagnóstico pode estar contribuindo para o desenvolvimento do estado pró-inflamatório e de alterações renais;
  
- ❖ A relação albumina/creatinina urinárias aumentada sugere o desenvolvimento de um quadro inicial de comprometimento renal;
  
- ❖ O aumento da expressão do RNAm de *TLR2*, *TLR4*, *MYD88* e *NFKB* sugere que a ativação dos TLR2 e TLR4 pode contribuir para a instalação e/ou manutenção do estado pró-inflamatório no DM1;
  
- ❖ Os pacientes que apresentaram albuminúria verificou-se o aumento de 43 vezes na expressão *MCPI/CCL2* e de 30 vezes *IL18* em relação aos outros pacientes diabéticos;
  
- ❖ O conjunto de resultados evidencia um estado inflamatório, possivelmente mediado por TLR2 e TLR4, que estaria contribuindo para um comprometimento renal inicial, caracterizado pela albuminúria, em uma população pediátrica.

## REFERÊNCIAS

- ADA, A. D. A. Standards of medical care in diabetes-2014. **Diabetes care**, v. 37 Suppl 1, n. October 2013, p. S14–80, jan. 2014.
- AL-AGHA, A. E.; OCHEL TREE, A.; HAKEEM, A. Occurrence of microalbuminuria among children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. **Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia**, v. 24, n. 6, p. 1180–8, nov. 2013.
- ANDERSON, B. J.; MCKAY, S. V. Barriers to glycemic control in youth with type 1 diabetes and type 2 diabetes. **Pediatric diabetes**, v. 12, n. 3 Pt 1, p. 197–205, maio 2011.
- ARORA, M. K.; SINGH, U. K. Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update. **Vascular pharmacology**, v. 58, n. 4, p. 259–71, abr. 2013.
- BELLE, T. O. M. L. V. A. N.; COPPIETERS, K. E. N. T.; HERRATH, M. G. V. O. N. Type 1 Diabetes : Etiology , Immunology , and Therapeutic Strategies. p. 79–118, 2011.
- BOGDANOVIĆ, R. Diabetic nephropathy in children and adolescents. **Pediatric nephrology (Berlin, Germany)**, v. 23, n. 4, p. 507–25, abr. 2008.
- BOGDANOVIĆ, R. Diabetic nephropathy in children and adolescents. **Pediatric nephrology (Berlin, Germany)**, v. 23, n. 4, p. 507–25, abr. 2008.
- BRASIL. **Vigitel Brasil 2011: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2012. p. 132
- CARE, M. Standards of medical care in diabetes--2013. **Diabetes care**, v. 36 Suppl 1, n. October 2012, p. S11–66, jan. 2013.
- CHERNEY, D. Z. I. et al. Urinary markers of renal inflammation in adolescents with Type 1 diabetes mellitus and normoalbuminuria. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 29, n. 10, p. 1297–302, out. 2012.
- CHO, Y. H. et al. Microvascular complications assessment in adolescents with 2- to 5-yr duration of type 1 diabetes from 1990 to 2006. **Pediatric diabetes**, v. 12, n. 8, p. 682–9, dez. 2011.
- CHO, Y. H. et al. Microvascular complications assessment in adolescents with 2- to 5-yr duration of type 1 diabetes from 1990 to 2006. **Pediatric diabetes**, v. 12, n. 8, p. 682–9, dez. 2011.
- DASU, M. R.; RAMIREZ, S.; ISSEROFF, R. R. Toll-like receptors and diabetes: a therapeutic perspective. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 122, n. 5, p. 203–14, mar. 2012.

DCCT. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. **The New England journal of medicine**, v. 329, n. 14, p. 977–86, 30 set. 1993.

DEMIREL, F. et al. Microvascular complications in adolescents with type 1 diabetes mellitus. **Journal of clinical research in pediatric endocrinology**, v. 5, n. 3, p. 145–9, 10 set. 2013.

DEVARAJ, S. et al. Demonstration of increased toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 expression in monocytes of type 1 diabetes mellitus patients with microvascular complications. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 60, n. 2, p. 256–9, fev. 2011.

DEVARAJ, S. et al. Knockout of toll-like receptor-2 attenuates both the proinflammatory state of diabetes and incipient diabetic nephropathy. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 8, p. 1796–804, ago. 2011.

DUARTE, V. M. G. et al. Osteopenia: a bone disorder associated with diabetes mellitus. **Journal of bone and mineral metabolism**, v. 23, n. 1, p. 58–68, jan. 2005.

ELMARAQBY, A. A.; SULLIVAN, J. C. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **Cardiovascular therapeutics**, v. 30, n. 1, p. 49–59, fev. 2012.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological reviews**, v. 93, n. 1, p. 137–88, jan. 2013.

FUJITA, T. et al. Interleukin-18 contributes more closely to the progression of diabetic nephropathy than other diabetic complications. **Acta diabetologica**, v. 49, n. 2, p. 111–7, abr. 2012.

FUKATA, M.; VAMADEVAN, A. S.; ABREU, M. T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. **Seminars in immunology**, v. 21, n. 4, p. 242–53, ago. 2009.

FUKATA, M.; VAMADEVAN, A. S.; ABREU, M. T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. **Seminars in immunology**, v. 21, n. 4, p. 242–53, ago. 2009.

GLUBA, A. et al. The role of Toll-like receptors in renal diseases. **Nature reviews. Nephrology**, v. 6, n. 4, p. 224–35, abr. 2010.

GRIECO, F. A. et al. Innate immunity and the pathogenesis of type 1 diabetes. **Seminars in immunopathology**, v. 33, n. 1, p. 57–66, jan. 2011.

HAMANN, C. et al. Bone, sweet bone--osteoporotic fractures in diabetes mellitus. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 8, n. 5, p. 297–305, maio 2012.

HARJUTSALO, V.; GROOP, P.-H. Epidemiology and Risk Factors for Diabetic Kidney Disease. **Advances in chronic kidney disease**, v. 21, n. 3, p. 260–266, maio 2014.

HOFBAUER, L. C. et al. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 9, p. 1317–28, out. 2007.

IDF, I. D. A. **IDF DIABETES ATLAS**. Sixth edit ed. [s.l.] IDF DIABETES ATLAS, 2013. p. 160

JHA, J. C.; JANDELEIT-DAHM, K. A M.; COOPER, M. E. New Insights Into the Use of Biomarkers of Diabetic Nephropathy. **Advances in chronic kidney disease**, v. 21, n. 3, p. 318–326, maio 2014.

KAUR, H.; CHIEN, A.; JIALAL, I. Hyperglycemia induces Toll like receptor 4 expression and activity in mouse mesangial cells: relevance to diabetic nephropathy. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 303, n. 8, p. F1145–50, 15 out. 2012.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–84, maio 2010.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637–50, 27 maio 2011.

KUZMICKI, M. et al. The expression of genes involved in NF- $\kappa$ B activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with gestational diabetes. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 168, n. 3, p. 419–27, mar. 2013.

LAGRANHA, C.; FIORINO, P. Bases moleculares da glomerulopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 6, p. 901–912, 2007.

LEWIS, G.; MAXWELL, A. P. Risk factor control is key in diabetic nephropathy. **The Practitioner**, v. 258, n. 1768, p. 13–7, 2, mar. 2014.

LIM, A. K. H.; TESCH, G. H. Inflammation in diabetic nephropathy. **Mediators of inflammation**, v. 2012, p. 146154, jan. 2012.

LIN, M.; TANG, S. C. W. Toll-like receptors: sensing and reacting to diabetic injury in the kidney. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 29, n. 4, p. 746–54, abr. 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LORENZO, O. et al. Potential role of nuclear factor  $\kappa$ B in diabetic cardiomyopathy. **Mediators of inflammation**, v. 2011, p. 652097, jan. 2011.

LOUREIRO, M. B. et al. Low bone mineral density is associated to poor glycemic control and increased OPG expression in children and adolescents with type 1 diabetes. **Diabetes research and clinical practice**, v. 103, n. 3, p. 452–7, mar. 2014.

MARCOVECCHIO, M. L. et al. The contribution of glycemic control to impaired growth during puberty in young people with type 1 diabetes and microalbuminuria. **Pediatric diabetes**, v. 15, n. 4, p. 303–8, jun. 2014.

MARRON, T. U. et al. Toll-like receptor 4-, 7-, and 8-activated myeloid cells from patients with X-linked agammaglobulinemia produce enhanced inflammatory cytokines. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 129, n. 1, p. 184–90.e1–4, jan. 2012.

MIYAUCHI, K. et al. Upregulated IL-18 expression in type 2 diabetic subjects with nephropathy: TGF-beta1 enhanced IL-18 expression in human renal proximal tubular epithelial cells. **Diabetes research and clinical practice**, v. 83, n. 2, p. 190–9, mar. 2009.

MÖLLSTEN, A. et al. The V16A polymorphism in SOD2 is associated with increased risk of diabetic nephropathy and cardiovascular disease in type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 52, n. 12, p. 2590–3, dez. 2009.

MORESCO, R. N. et al. Diabetic nephropathy: traditional to proteomic markers. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 421, p. 17–30, jun. 2013.

MUDALIAR, H. et al. The role of Toll-like receptor proteins (TLR) 2 and 4 in mediating inflammation in proximal tubules. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 305, n. 2, p. F143–54, 15 jul. 2013.

NAVARRO-GONZÁLEZ, J. F. et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nature reviews. Nephrology**, v. 7, n. 6, p. 327–40, jun. 2011.

PASQUALOTTO, K. Diabetes mellitus e Complicações. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. November, p. 134–145, 2012.

PICCIRILLO, L. J. et al. Marcadores de inflamação em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 2, p. 253–260, 2004.

PINO, S. C.; KRUGER, A. J.; BORTELL, R. NIH Public Access. v. 17, n. 2, p. 126–130, 2011.

SALGADO, P. P. C. DE A. **PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À NEFROPATIA DIABÉTICA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual. Volume 1.** Third Edit ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SBD, D. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014/Sociedade Brasileira de Diabetes.** AC FARMACÊ ed. SÃO PAULO: [s.n.]. p. 382

SINGH, V. P. et al. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. **The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 1–14, fev. 2014.

- STECK, A. K.; REWERS, M. J. Genetics of type 1 diabetes. **Clinical chemistry**, v. 57, n. 2, p. 176–85, fev. 2011.
- SUN, Y.-M. et al. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 433, n. 4, p. 359–61, 19 abr. 2013.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International immunology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, jan. 2005.
- TESCH, G. H. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 294, n. 4, p. F697–701, abr. 2008.
- TESCH, G. H. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 294, n. 4, p. F697–701, abr. 2008.
- THOMAS, M. C. Glycemic Exposure, Glycemic Control, and Metabolic Karma in Diabetic Complications. **Advances in chronic kidney disease**, v. 21, n. 3, p. 311–317, maio 2014.
- TIMÓTEO, C. et al. [Growth and puberty in type 1 diabetes mellitus - experience from a pediatric endocrinology unit]. **Acta médica portuguesa**, v. 25, n. 4, p. 213–8, 2012.
- URURAHY, M. A. G. et al. Increased TLR2 expression in patients with type 1 diabetes: evidenced risk of microalbuminuria. **Pediatric diabetes**, v. 13, n. 2, p. 147–54, mar. 2012.
- VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiological reviews**, v. 91, n. 1, p. 79–118, jan. 2011.
- VESTERGAARD, P.; REJNMARK, L.; MOSEKILDE, L. Diabetes and its complications and their relationship with risk of fractures in type 1 and 2 diabetes. **Calcified tissue international**, v. 84, n. 1, p. 45–55, jan. 2009.
- WADA, J.; MAKINO, H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 124, n. 3, p. 139–52, fev. 2013.
- WASHINGTON, R. E. et al. Incidence of type 1 and type 2 diabetes in youth in the US Virgin Islands, 2001-2010. **Pediatric diabetes**, v. 9999, n. 9999, p. 1–8, ago. 2012.
- WHITING, D. R. et al. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes research and clinical practice**, v. 94, n. 3, p. 311–21, dez. 2011.

# APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE - UFRN  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Projeto de pesquisa: ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *NFKB*, *MCPI/CCL2* E *IL18* COM DESENVOLVIMENTO DA NEFROPATIA EM PACIENTES COM *DIABETES MELLITUS TIPO1***

Meu nome é Adriana Augusto de Rezende, sou professora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e estou convidando seu filho (a) para participar do projeto de pesquisa que estou desenvolvendo com a equipe de Hospital de Pediatria Professor Heriberto Bezerra (HOSPED). A pesquisa está sendo realizada em colaboração com pesquisadores da Faculdade Ciências Farmacêuticas/USP. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar as alterações bioquímicas e moleculares (RNA e proteínas) no sangue e na urina de pacientes com diabetes tipo 1 e indivíduos saudáveis. O estudo do RNA e de proteínas (substâncias produzidas a partir da molécula de DNA), a expressão destes genes (ou seja, avaliaremos os compostos produzidos pelo DNA). Caso você, responsável legal, e também a própria criança/adolescente aceitem que ela participe desta pesquisa, vamos coletar uma amostra de sangue (17 mL) e a amostra da primeira urina da manhã dessa criança/adolescente para realização dos testes genéticos e de dosagens bioquímicas. Além de seu filho (a), outras cento e noventa e nove crianças/adolescentes também participarão da pesquisa. Também será necessário que você, responsável legal, responda algumas perguntas sobre doenças existentes nos seus familiares, medicamentos que a criança/adolescente está tomando e outras informações relacionadas com a pesquisa.

O material biológico (RNA, proteínas, soro e urina) obtido será armazenado no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFRN sob a minha responsabilidade e para isto pedimos sua autorização e neste mesmo laboratório as análises serão realizadas.

Caso haja interesse de realizarmos futuras pesquisas entraremos em contato com você, e somente com sua autorização e a de seu filho (a), e a aprovação dos novos projetos no Comitê de Ética em Pesquisa realizaremos os estudos.

Serão assegurados:

**Confidencialidade do estudo:** Os registros da participação no estudo serão mantidos confidenciais. Eles serão guardados e somente os pesquisadores do Projeto terão acesso. Cada pessoa participante receberá um número para ser utilizado na pesquisa. Se qualquer relatório ou artigo resultar deste trabalho, a identificação não será revelada.

**Dano decorrente da pesquisa:** Em qualquer momento, se o paciente tiver algum problema de saúde decorrente da pesquisa, será garantido atendimento médico na instituição.

**Riscos inerentes da coleta:** O risco a saúde será mínimo, por causa da coleta de sangue que pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. Riscos esses que serão minimizados através de procedimentos de coleta cuidadosos.

**Ressarcimento de despesas:** O pesquisador será responsável pelo ressarcimento de eventuais despesas decorrentes da pesquisa.

A participação neste estudo é totalmente voluntária, podendo recusar-se fazer parte do mesmo ou interromper se julgar conveniente, sem prejuízo para o andamento do trabalho de pesquisa. Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa pode entrar em contato com a **Profa. Dra. Adriana Augusto de Rezende** ou com o Dr. Ricardo Fernando Arrais, dentro da estrutura médico-hospitalar da HOSPED/UFRN a qualquer hora do dia (telefone:3342-9807).

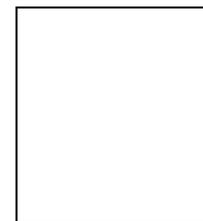
Informações adicionais podem ser obtidas pelo telefone 3202-3719 ramal 276.

#### **Consentimento para participação**

Estou de acordo com a participação do estudo descrito acima. Fui devidamente esclarecido (a) quanto aos objetivos da pesquisa, aos procedimentos aos quais meu filho (a) será submetido (a). Foram garantidos esclarecimentos que eu venha a solicitar durante o curso da pesquisa e o direito de desistir a qualquer momento, sem que a desistência implique em qualquer prejuízo ao meu filho (a) ou à minha família. A participação na pesquisa não implicará em custos ou prejuízos adicionais, sejam eles de caráter econômico, social, psicológico ou moral. Foi garantido o anonimato, o sigilo dos dados referentes a identificação e o compromisso de que serei contactado (a) para avaliação de estudo futuro usando as amostras biológicas obtidas nesse instante.

Natal, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
**Responsável Legal do Participante**



(Polegar Direito)

-----

**Pesquisador Responsável**

## APÊNDICE B – FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS

### ➤ Dados do paciente

Paciente N°:

Nome completo:

Registro ambulatorial N°:

Documento de identidade N°:

Sexo:

Data de nascimento:

Endereço:

N°

Bairro:

Cidade:

CEP:

Telefone:

Descendência:

Há quanto tempo é diabético?

Naturalidade

1) Possui alguma doença além do Diabetes mellitus tipo 1?

Paciente:

1. Sim ( ) Qual: \_\_\_\_\_ 2. Não ( )

Pai:

2) Toma medicamentos? Quais?

Mãe:

1. Sim ( ) 2. Não ( )

-----  
-----

3) Pratica exercício aeróbico?

1. Sim ( ) 2. Não ( )

Qual frequência?

1. Mínima ( ) 2. Leve ( ) 3. Moderada ( ) 4. Intensa ( )

### ➤ Histórico familiar

1) Possui algum parente com:

1. Diabetes mellitus ( ) 2. Obesidade ( ) 3. Hipertensão ( )

4. Doença cardiovascular ( ) 5. Hipercolesterolemia ( ) 6. Tireóide ( )

7. Doença Óssea ( ) 8. Não tem ( ) 9. Não sabe ( )

2) Quem? \_\_\_\_\_

➤ **Exames físicos**

Peso (Kg):

Altura (m):

IMC:

Pressão arterial (mmHg):

Dosagem de insulina:

Classificação de Tanner:

➤ **Classificação Econômica**

Posse de itens	Não tem	TEM (quantidade)			
		1	2	3	4
<b>Televisores em cores</b>	0	1	2	3	4
<b>Videocassete/DVD</b>	0	2	2	2	2
<b>Rádios</b>	0	1	2	3	4
<b>Banheiros</b>	0	4	5	6	7
<b>Automóveis</b>	0	4	7	9	9
<b>Empregadas mensalistas</b>	0	3	4	4	4
<b>Máquinas de lavar</b>	0	2	2	2	2
<b>Geladeira</b>	0	4	4	4	4
<b>Freezer (*)</b>	0	2	2	2	2

(\*) Independente ou a 2ª porta da geladeira

**Grau de Instrução do chefe da família**

Nomenclatura antiga	Pontos	Nomenclatura atual
Analfabeto/Primário incompleto	0	Analfabeto/até 3ª série fundamental
Primário completo	1	4ª série fundamental
Ginasial completo	2	Fundamental completo
Colegial completo	4	Médio completo
Superior completo	8	Superior completo

## ANEXO 1 - PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPED



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
HOSPITAL DE PEDIATRIA PROF. HERIBERTO FERREIRA BEZERRA  
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA  
COMISSÃO DE PESQUISA



CP/HOSPED/DPEDI/UFRN-PROJETO N° 04/2013

Natal, 04 de abril de 2013.

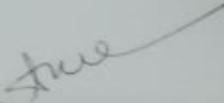
**PARECER**

O Projeto de Pesquisa intitulado "ESTUDOS DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES TLR 2, NF-KB, MCP-1 E IL-18 COM DESENVOLVIMENTO DA NEFROPATIA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1", coordenado pela Profa Dra Adriana Augusto de Rezende, foi avaliado e cadastrado para execução dentro de estrutura do Hospital de Pediatria Prof. Heriberto Ferreira Bezerra sem restrições, desde que aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa/UFRN.

Do ponto de vista científico, o projeto esta adequadamente e bem elaborado.

**Conclusão da Comissão:** Favorável à execução do projeto.

Atenciosamente,



Aurea Noqueira de Melo  
Coordenadora de Pesquisa - HOSPED  
**Aurea Noqueira de Melo**  
Coordenadora da Comissão de Pesquisa

**ANEXO 2 - CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO ECONÔMICA  
BRASIL**

<b>Classe</b>	<b>Pontos</b>	<b>Renda média familiar Valor bruto em R\$ Ano base 2012</b>
<b>A1</b>	42 - 46	12.926
<b>A2</b>	35 - 41	8.418
<b>B1</b>	29 - 34	4.418
<b>B2</b>	23 - 28	2.565
<b>C1</b>	18 - 22	1.541
<b>C2</b>	14 - 17	1.024
<b>D</b>	8 - 13	714
<b>E</b>	0 - 7	477

**Fonte:** ABEP - Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa – 2012 – [www.abep.org](http://www.abep.org)  
– [abep@abep.org](mailto:abep@abep.org). Dados com base no Levantamento Sócio Econômico 2012 - IBOPE

### ANEXO 3 – VALORES DE REFERÊNCIA PARA OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Parâmetros	Valores de referências
Glicose	0 a 6 anos: 100 a 180mg/dL*
	6 a 12 anos: 90 a 180mg/dL*
	13 a 19 anos: 90 a 130mg/dL*
Hemoglobina glicada	0 a 6 anos: 8 a 8,5%*
	6 a 12 anos: 7,5 a 8%*
	13 a 19 anos: 7 a 7,5%*
Colesterol Total	< 170 mg/dL (2-19 anos) #
LDL-c	<110 mg/dL (2-19 anos) #
HDL-c	>40 mg/dL (2-10anos) #
	>35 mg/dL (2-19 anos) #
VLDL-c	10 a 50 mg/dL #
Triglicerídeos	<150mg/dL(2-19 anos) #
Ureia	15 a 40mg/dL #
Creatinina	Feminino: 0,6 a 1,0mg/dL #
	Masculino: 0,8 a 1,3mg/dL #
Relação albumina/creatinina	Normal: <30µg/mg de creatinina*
	Microalbuminúria: 30-299µg/mg de creatinina*
Protéínas Totais	6,4 a 8,2 g/dL #
Albumina	3,4 a 5,0 g/dL #
Globulinas	1,5 a 3,0 g/dL #

\*Valores preconizados pela *American Diabetes Association* (2014);

#Valores de referência encontrados nos prospectos dos kits.