

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

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES *RANK*, *RANKL* E *OPG* COM
A OSTEOPATIA DIABÉTICA

MELINA BEZERRA LOUREIRO

NATAL/RN
2014

MELINA BEZERRA LOUREIRO

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES *RANK*, *RANKL* E *OPG* COM
A OSTEOPATIA DIABÉTICA

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde da Universidade
Federal do Rio Grande do Norte
como requisito para a obtenção
do título de Doutora em Ciências
da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Augusto de Rezende

NATAL/RN

2014

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

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Prof. Dr. Erivaldo Sócrates Tabosa do Egito

MELINA BEZERRA LOUREIRO

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES *RANK*, *RANKL* E *OPG* COM
A OSTEOPATIA DIABÉTICA

Aprovada em ____/____/____

Banca examinadora:

Presidente da Banca: Profa. Dra. Adriana Augusto de Rezende

Membros da Banca:

DEDICATÓRIA

À Deus,

Por todo o Amor à nós dedicado, incondicionalmente, apesar dos nossos erros. Obrigada senhor pelo dom da vida e da sabedoria essenciais para conquista desse sonho, pois só Vós nas horas difíceis foi quem me deu sustento e coragem para prosseguir!

Aos meus avós (Nestor e Marlene),

Exemplos de ternura, apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida! Vovô Nestor, dedico esta conquista ao senhor, "*Maior amor da minha vida!*" Por todo exemplo de dignidade, honestidade e perseverança.

Aos meus pais,

Por terem me colocado no mundo e plantado em mim a busca constante pelos meus sonhos.

À minha mãe,

Por toda dedicação e amor por mim! Foi por sua total doação, sempre em prol do meu bem estar que sou quem sou e estou onde estou!

Ao meu Amor (Aarão Fernandes),

Por todo o teu apoio, a tua tranquilidade e dedicação foram essenciais para a finalização deste sonho. Sem teus carinhos e tua palavra de consolo tudo teria sido mais difícil! Obrigada por toda compreensão e paciência!

Amo você!

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Adriana Augusto de Rezende**, que ao longo destes 10 anos de convivência tanto me ajudou, me orientando de forma paciente e dedicada, abrindo caminhos para a realização deste e de outros trabalhos; e contribuindo, de forma única, para me tornar uma melhor profissional e pesquisadora.

À **Profa. Dra. Maria das Graças Almeida** pela disponibilidade e ensinamentos, contribuindo para a minha formação profissional.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Fernando Arrais**, pela contribuição fundamental para a realização deste trabalho e pelo exemplo de vida e profissionalismo. Sem eles a realização deste trabalho não seria possível.

Ao **Dr. José Jorge Maciel Neto**, pela contribuição fundamental na realização da densitometria óssea dos indivíduos estudados e pelo exemplo de vida e profissionalismo. Sem eles a realização deste trabalho não seria possível.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde** pela contribuição na minha formação profissional.

À **Escola Estadual Leonor Lima**, através da Profa. Tânia; à **Escola Estadual Dom Anselmo Adelino Dantas**, através da Profa. Maria do Socorro; e ao **Centro Educacional Senador Jessé Pinto Freire**, através da Profa. Ângela, pela recepção acolhedora, disponibilidade e apoio à realização deste trabalho.

A **todos os funcionários do Hospital de Pediatria**, através da enfermeira Marilda Câmara de Oliveira pela disponibilidade e cooperação.

À **CAPES**, ao **CNPq** e à **FAPERN** pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

Aos funcionários **Alana, Biagna, Genivan e Kalieny**, pela presença amiga, atenção, ajuda, paciência e disponibilidade, sempre.

À minha segunda família, meus amigos e companheiros de pesquisa, que fizeram e/ou fazem parte do LABMULT/LABIOMOL: **André, Beth, Ciele, Fabrício, Felipe, Freire, Gabriel, Gustavo, Heglayne, João Felipe, Karla,**

Leandro, Leila, Marcela, Raul, Thamara, Thaynnan, Valéria, Vinícius e Yonara.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão de RNAm e os polimorfismos dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* de crianças, adolescentes e adultos jovens com DM1, bem como estudar a associação dos mesmos com o desenvolvimento de alterações no metabolismo ósseo. No total, foram incluídos no estudo 119 crianças e adolescentes com DM1 e 161 indivíduos normoglicêmicos (NG) da mesma faixa etária. Foram pesquisados os polimorfismos dos genes *OPG* (1181G>C e 163A>G), *RANK* (575C>T e 3'UTRC>A) e *RANKL* (ÍntronA>G) e determinadas as expressões gênicas de *OPG*, *RANK* e *RANKL*. Além disso, foram avaliados o controle glicêmico e parâmetros laboratoriais de função óssea, além da densitometria óssea. Os indivíduos com DM1 apresentaram um controle glicêmico insatisfatório e valores diminuídos de cálcio total, propeptídeo do colágeno tipo 1 (CTX), como também baixa densidade mineral óssea, quando comparados com os NG ($p < 0,05$). Estudando apenas os indivíduos com DM1, foi observado que os portadores do genótipo *OPG1181 CC* apresentaram maiores concentrações de cálcio ionizado no modelo recessivo ($p < 0,05$). A presença de genótipo *OPG 1181 CC* pode favorecer a um aumento nas concentrações de cálcio ionizado podendo assim sugerir que os pacientes com DM1 que apresentam este genótipo estariam mais suscetíveis a desenvolver alterações no metabolismo ósseo. Assim, estes indivíduos podem vir a apresentar um comprometimento estatural, podendo não atingir um pico de massa óssea adequada, bem como, podem estar mais susceptíveis ao desenvolvimento de fraturas e osteoporose precoce.

Palavras-chave: Diabetes tipo 1, metabolismo ósseo, Sistema RANK/RANKL/OPG, expressão gênica, polimorfismos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct – Ciclo de *threshold*
CTX – telopeptídeo do colágeno tipo 1
DEPC – Dietil pirocarbonato
DM – *Diabetes mellitus*
DM1 – *Diabetes mellitus* tipo 1
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAL – fosfatase alcalina
GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
NF- κ B – Fator nuclear kappa-B
NG – Normoglicêmico
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPG – osteoprotegerina
RANK – Receptor Ativador de NF κ B
RANKL - Receptor Ativador de NF κ B Ligante
RNA – Ácido ribonucleico
TNF – Fator de necrose tumoral
UBC – Ubiquitina C

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Expressão de RNAm em PBMCs do gene *RANKL*.....61

FIGURA 2 - Expressão de RNAm em PBMCs do gene *RANK*.....61

FIGURA 3 - Expressão de RNAm em PBMCs do gene *OPG*61

FIGURA 4 - Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos estudados para os grupos NG e DM1.....62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Iniciadores e sondas utilizados para a seleção do gene de referência.....	24
TABELA 2 - Estabilidade dos genes de referência testados na população de estudo, utilizando o NormFinder e o programa Genorm.....	25
TABELA 3 - Iniciadores e sondas utilizados para a avaliação da expressão dos genes estudados.....	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivos específicos	18
4 MÉTODOS	19
4.1 Casuística	19
4.2 Amostras biológicas	19
4.3 Determinação dos parâmetros laboratoriais	20
4.4 Densidade mineral óssea	20
4.5 Pesquisa de polimorfismos nos genes <i>OPG</i> , <i>RANK</i> e <i>RANKL</i>	21
4.6 Análise da expressão dos genes <i>OPG</i> , <i>RANK</i> e <i>RANKL</i>	22
4.7 Análises estatísticas	26
5 ARTIGOS PRODUZIDOS	28
6 COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E CONCLUSÕES	48
7 REFERÊNCIAS	57
APÊNDICES	60
Apêndice 1 – Resultados complementares	61
Apêndice 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	63
Apêndice 3 – Ficha para coleta de dados individual	65
ANEXOS	67
Anexo 1 – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Diabetes mellitus* tipo 1: prevalência e fisiopatologia

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma das mais importantes doenças crônicas que afeta a sociedade moderna. É um problema de saúde universal, que acomete todas as classes socioeconômicas e países em todos os estágios de desenvolvimento. A incidência e prevalência têm aumentado nos últimos anos, o que o caracteriza como um problema de Saúde Pública, que além de estar associado a complicações que comprometem a produtividade, qualidade de vida e sobrevida dos indivíduos, envolve altos custos no seu tratamento. Esta patologia tem sido indicada como uma das causas mais frequentes de diagnóstico de internação hospitalar, além de contribuir de forma significativa para outras causas como cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca e renal, acidente vascular cerebral, hipertensão arterial e infecções (1).

No Brasil, no final dos anos 80, a prevalência de DM na população adulta foi estimada em 7,6%; dados mais recentes apontam para taxas mais elevadas, como 12,1% no estudo de Ribeirão Preto, SP (2). Em 2005, estimou-se que existiram em torno de 8 milhões de indivíduos com DM no Brasil. A influência da idade na prevalência de DM e na tolerância à glicose diminuída foi bem evidenciada por este Estudo Multicêntrico sobre a Prevalência do Diabetes no Brasil, no qual se observou variação de 2,7% para a faixa etária de 30-59 anos e de 17,4% para a de 60- 69 anos, ou seja, um aumento de 6,4 vezes (3).

Os estudos de incidência são geralmente restritos ao *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), pois suas manifestações iniciais tendem a ser bem características. A incidência do DM1 demonstra acentuada variação geográfica, apresentando taxas por 100 mil indivíduos com menos de 15 anos de idade de 38,4 na Finlândia, de 7,6 no Brasil e de 0,5 na Coreia. Atualmente sabe-se que a incidência do DM1 vem aumentando, particularmente na população infantil com menos de 5 anos de idade (2). Na região Nordeste, e em particular no Estado do Rio Grande do Norte, estes estudos epidemiológicos são ainda mais escassos,

portanto não se conhece a incidência do DM1 em crianças e adolescentes desta região.

Estudos recentes veem evidenciando que a hiperglicemia é responsável pela alteração no metabolismo ósseo, acarretando um quadro de osteopenia e osteoporose progressiva, tanto em modelos animais quanto em pacientes, independente do gênero (4,5). Estudos realizados em crianças e adolescentes por Brandão et al, 2007 (Bahia, Brasil), demonstraram que indivíduos diabéticos tipo 1 com controle metabólico insatisfatório, e de acordo com o tempo de doença, poderão apresentar um comprometimento do desenvolvimento puberal e do crescimento, acarretando assim um pico de massa óssea inferior ao desejado na fase adulta (6).

Considerando que a puberdade está associada a mudanças metabólicas, hormonais e composição corporal, doenças crônicas como o diabetes pode ser considerada um fator de risco para alterações fisiológicas. Neste sentido, a hiperglicemia decorrente do diabetes influencia negativamente nas funções do organismo, inclusive as relacionadas ao metabolismo ósseo do indivíduo em desenvolvimento, já que a falta de insulina endógena pode alterar o *turnover* ósseo. Assim sendo, torna-se de fundamental importância estudar a influência da hiperglicemia no metabolismo ósseo, visando uma melhor qualidade de vida para o indivíduo acometido, cuja faixa etária mais freqüente é a infância e a adolescência.

1.2 Osteoimunologia e DM 1

O DM 1 está associado a várias desordens em nível do tecido ósseo, incluindo a diminuição da densidade óssea, aumento do risco de osteoporose e fraturas osteoporóticas, como também uma pauperização das características regenerativas deste tecido. Várias evidências sugerem que a ocorrência destas anormalidades no osso são decorrentes dos efeitos da hiperglicemia e deficiência de insulina sobre a formação óssea, que causam um impacto negativo na composição deste tecido. Os danos observados em nível de tecido

ósseo decorrentes da deficiência de insulina são: diminuição do crescimento linear ósseo durante a puberdade, aumento do risco de osteoporose na fase adulta, inadequada regeneração óssea e diminuição paulatina da densidade mineral óssea (DMO) (5-11).

Embora apenas recentemente a perda óssea tenha sido reconhecida como uma das complicações do diabetes, a coexistência da osteopenia nesta doença tem sido investigada desde que Albright et. al. (1948) relataram a redução da DMO em pacientes com DM1. Neste sentido, existe um consenso e estudos que suportam o risco à osteoporose para pacientes bem como modelos experimentais com DM 1 (4,7,12). Estudos realizados em humanos com o objetivo de avaliar a influência do diabetes no metabolismo ósseo durante a adolescência, demonstraram uma significativa diminuição da densidade óssea em adolescentes quando comparados aos respectivos controles (9,10,18,19). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a perda de massa óssea causada pelo DM atinge indistintamente homens, mulheres e crianças. A definição aceita é que se trata de uma doença do esqueleto caracterizada por uma baixa da massa óssea e deteriorização da microestrutura do tecido ósseo com conseqüente aumento da fragilidade do osso, proporcionando fraturas osteoporóticas.

No caso de doenças autoimune como DM1, a homeostase óssea será influenciada por componentes do sistema imune, através de efeitos diretos e indiretos dos linfócitos T sob os osteoclastos, células envolvidas no processo de reabsorção óssea. Um campo emergente nesta área é a osteoimunologia uma vez que a reabsorção óssea patológica é observada em condições inflamatórias, associada aos efeitos diretos e indiretos das células T nos osteoclastos²⁰⁻²¹. O papel das células T na biologia óssea tem sido mais aceito desde a descoberta do sistema RANK/RANKL/OPG (Receptor Ativador de NFκB / Receptor Ativador de NFκB Ligante / Osteoprotegerina) em meados da década de 90. A descoberta deste sistema pertencente à família do Fator de Necrose Tumoral (TNF) para a regulação da reabsorção óssea foi tida como um dos principais

avanços para esclarecer como ocorre a regulação dos processos de modelagem e remodelagem óssea. Estudos realizados antes da descoberta deste sistema demonstravam que as células estromais osteoblásticas regulavam a formação de osteoclastos, mas não se evidenciava que os osteoblastos poderiam influenciar na expressão de membros da superfamília TNF: RANK, RANKL, OPG ou citocinas que desempenhassem funções regulatórias no processo de remodelagem óssea (13).

O RANKL, uma proteína homotrimérica de ligação de membrana, foi inicialmente identificado nas células T, e em seguida em osteoblastos. É reconhecido como fator essencial para a osteoclastogênese, o que reforça a interrelação entre os sistemas ósseo e imune²⁰. As células T parecem promover a reabsorção óssea diretamente via expressão de RANKL, e indiretamente via expressão de citocinas pró-inflamatórias que irão mediar a expressão de RANKL em células não T, como osteoblastos. Desta forma, sua principal função no metabolismo ósseo é a estimulação da diferenciação e da atividade dos osteoclastos e inibição da apoptose dos mesmos (13,14).

Já o receptor de RANKL, o RANK, é expresso nas células dendríticas, endoteliais, fibroblastos, linfócitos T e B e nos osteoclastos. A ligação entre RANK e RANKL fornece sinais que direcionam o desenvolvimento dos osteoclastos nas células hematopoiéticas progenitoras e ativação dos osteoclastos maduros (15).

A OPG por sua vez, é uma glicoproteína produzida por vários tipos celulares, como: osteoblastos, células cardíacas, renais e do fígado. Estudos recentes relatam que as células B são responsáveis por 64% do total da produção de OPG na medula óssea. Atua de forma protetora, como um antagonista competitivo com o RANKL, impedindo que este último se ligue ao RANK presente nos osteoclastos e ative a osteoclastogênese. A sua principal função no metabolismo ósseo é inibir a atividade e a diferenciação dos osteoclastos (15,16).

Portanto, a remodelagem óssea parece ser controlada pelo equilíbrio entre estas três proteínas – RANK/RANKL/OPG. A OPG e/ou a modulação da função RANK/RANKL representam caminhos promissores para o tratamento e prevenção de condições osteopênicas e de destruição óssea como a osteoporose (16,17).

Vários estudos avaliam a associação entre polimorfismos do gene OPG e a densidade mineral óssea, mas os resultados obtidos têm sido inconsistentes e dependem do polimorfismo avaliado e da raça dos indivíduos estudados. Alguns estudos realizados mais recentemente relacionaram polimorfismos dos genes RANK e RANKL com a densidade mineral óssea, mas esses resultados permanecem controversos. Além disso, ainda não se sabe se esses polimorfismos afetam a proteína RANKL solúvel e marcadores circulantes do *turnover* ósseo (18).

De acordo com estudo realizado por Kim et al (2007), o polimorfismo do gene OPG G1181C foi relacionado com a diminuição da massa óssea em mulheres coreanas. Choi et al. (2005), também observaram resultados que sugeriam uma diminuição da densidade mineral óssea em mulheres coreanas pos-menopausadas com o genótipo 1181 GG para *OPG*, especialmente quando associado ao genótipo 575 TT para o *RANK*.

Atualmente o diagnóstico da osteopatia pode ser feito através de marcadores bioquímicos circulantes, onde é possível avaliar a função das células do tecido ósseo, associados a exames de imagem para que assim seja possível diagnosticar de forma satisfatória o paciente. Interessantemente, os marcadores bioquímicos são considerados não-invasivos, e podem revelar alterações agudas da homeostase óssea. Entretanto, espera-se que a utilização de marcadores moleculares possa se tornar uma realidade o mais breve possível, preliminarizando um avanço do diagnóstico individualizado e a aplicação da farmacogenômica.

2. JUSTIFICATIVA

O DM1 é a doença crônica mais comum em crianças e adolescentes, acometendo de 10 a 20 milhões de pessoas em todo o mundo. As complicações decorrentes do DM1 estão associadas a diversos órgãos e tecidos, podendo comprometer seriamente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos por essa doença. Apesar do avanço no estudo dos fatores relacionados ao desenvolvimento do DM1 e de suas complicações, os mecanismos envolvidos na fisiopatologia tanto do DM1 quanto de suas complicações permanecem não totalmente elucidados.

Pesquisas recentes, experimentais e clínicas têm reforçado que o quadro de hiperglicemia prolongada decorrente do DM1 é um fator negativo ao metabolismo ósseo, que altera o metabolismo celular, acarretando assim um desequilíbrio na homeostase do tecido ósseo. Sendo assim, torna-se de fundamental importância avaliar marcadores bioquímicos e moleculares do metabolismo ósseo, densidade mineral óssea, bem como estudar a associação de polimorfismos dos genes RANK, RANKL e OPG com o DM1 e alterações no metabolismo ósseo, com o propósito de identificar precocemente a osteopatia diabética em crianças e adolescentes. Considerando-se que estas crianças e adolescentes encontram-se num período da vida caracterizado por um intenso desenvolvimento hormonal, fisiológico, nutricional, cognitivo e com mudanças psicológicas que poderão ser afetadas pela morbidade da doença, é imprescindível a realização de um acompanhamento que favoreça o retardo das complicações associadas ao diabetes. Desta forma, o presente trabalho trouxe contribuições para a elucidação dos processos envolvidos no desenvolvimento da osteopatia diabética em pacientes com DM1.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de RNAm e os polimorfismos dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* de indivíduos com DM1, bem como estudar a associação dos mesmos com o desenvolvimento de alterações no metabolismo ósseo.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros demográficos e tempo de diagnóstico das crianças e adolescentes estudados;
- Avaliar o controle glicêmico dos sujeitos através da concentração de glicemia de jejum e hemoglobina glicada;
- Determinar a concentração de marcadores do metabolismo óssea como: cálcio total e ionizado, fósforo, e CTX; Determinar a atividade das enzimas: FAL total e FAL ósseo-específica;
- Avaliar a densidade mineral óssea lombar (L1-L4);
- Determinar as frequências genotípica e alélica dos polimorfismos dos genes *OPG* (1181 G>C e 163 A>G), *RANK* (575 C>T e 3'UTR C>A) e *RANKL* (Íntron A>G);
- Medir a expressão do mRNA de *OPG*, *RANK* e *RANKL* em células mononucleares do sangue periférico;
- Correlacionar parâmetros bioquímicos e moleculares a fim de verificar a associação de *OPG*, *RANK* e *RANKL* com o controle glicêmico, marcadores do metabolismo ósseo e densitometria óssea, em pacientes pediátricos e adolescentes com DM1.

4. MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram selecionados 119 pacientes diabéticos, com idade entre 6 e 20 anos, no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Pediatria da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), em Natal/RN. Os indivíduos normoglicêmicos (n=161) com idade e sexo semelhantes aos diabéticos foram selecionados em escolas públicas da mesma cidade. Os critérios de exclusão foram: doenças inflamatórias, doenças sistêmicas que podem afetar a DMO, infecções e gravidez. O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e direção do Hospital de Pediatria/UFRN e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL/UFRN). Todos os pacientes e/ou seus pais foram informados do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após a realização do histórico médico e do exame físico foram obtidos o sangue (em jejum) para a realização das determinações bioquímicas e moleculares.

4.2 Amostras biológicas

Foram coletados 19 mL de sangue, após jejum de 8-12 horas, de todos os pacientes para a determinação das concentrações de glicemia de jejum, hemoglobina glicada, cálcio total e ionizado, fósforo e telopeptídeo carboxi terminal do colágeno tipo 1 (CTX); além da atividade da fosfatase alcalina total, fosfatase alcalina ósseo-específica, e extração de RNA total e DNA genômico. 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).

4.3 Determinação dos parâmetros laboratoriais

As concentrações séricas de glicose, cálcio total, fósforo e atividade da fosfatase alcalina total 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). Em relação à dosagem da concentração sérica de cálcio ionizado, esta foi realizada através do *Electrolyte Analyser* AVL 9180, Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺ analyzer, eletrodo seletivo (ROCHE, Geórgia, EUA). As dosagens destes parâmetros foram realizadas no Laboratório Integrado de Análises Toxicológicas e Clínicas – LIATEC/Natal/RN.

A atividade da fosfatase alcalina ósseo-específica foi determinada por quimioluminescência através do Liaison (DiaSorin-Diagnostics, EUA); as concentrações de CTX foram determinadas pelo método de electroquimioluminescência através do Modular (Modular Analytics, E170 Modular; Roche, Mannheim, Alemanha). As dosagens destes parâmetros foram realizadas no Laboratório Álvaro – São Paulo/SP.

A determinação da hemoglobina glicada, a partir de sangue total, foi realizada utilizando o kit LABTEST (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante. Estas dosagens foram realizadas no Laboratório Multidisciplinar - LABMULT do PPgCF/UFRN, e efetuadas no espectrofotômetro RA 50 (*Chemistry System Bayer Diagnostic*, Dublin, Irlanda).

4.4 Densidade mineral óssea

A avaliação da DMO foi conduzida a partir da densitometria óssea utilizando o método da absorciometria por duplo feixe de Raios-X (DXA, do inglês *Dual-energy X-ray Absorptiometry*), através do aparelho da marca LUNAR-GE, modelo *DPX-NT alpha Dual Energy X-Ray Bone Densitometer*

(*Lunar Radiation Corporation*, EUA). A região do corpo humano avaliada foi a coluna lombar (vértebras L1-L4), composta principalmente pelo osso trabecular, que se mostra mais sensível às ações hormonais e aos efeitos dos medicamentos, quando comparada a outras áreas corporais constituídas, principalmente, por ossos corticais (ANIJAR, 2003). Os exames foram realizados no Instituto de Radiologia de Natal/RN.

Os resultados da densitometria óssea em indivíduos de até 20 anos de idade são relatados como *Z-score*. O *Z-score* utiliza os desvios-padrão (DP) encontrados acima e abaixo da média de densidade mineral óssea de uma população, cuja faixa etária seja comparável à do paciente. Foram utilizados os critérios definidos pela Sociedade Brasileira de Densitometria Óssea para a definição da diminuição da densidade mineral óssea (ZERBINI et al., 2007).

4.5 Pesquisa de polimorfismos nos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL*

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) foram isoladas por gradiente descontínuo de Ficoll-Hipaque (Sigma-Aldrich, MO, EUA), densidade específica de 1,070g/mL, à temperatura ambiente. Posteriormente, o DNA genômico foi obtido utilizando o kit comercial Illustra Triple Prep (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) de acordo com as orientações do fabricante. O DNA foi armazenado a -20°C até o momento das análises dos polimorfismos.

A pesquisa dos polimorfismos *OPG* 1181 G>C (rs 2073618), *OPG* 163 A>G (rs 3102735), *RANK* 575 C>T (rs 1805034), *RANK* 3'UTR C>A (rs 884205) e *RANKL* Íntron A>G (rs 9594766) foi realizada pela técnica da discriminação alélica (sistema TaqMan®) em um sistema de PCR em tempo real 7500 fast (Applied BioSystems, Foster City, EUA). Os polimorfismos *OPG* 1181 G>C, *OPG* 163 A>G, *RANK* 575 C>T, *RANK* 3'UTR C>A e *RANKL* Íntron A>G foram detectados utilizando ensaios TaqMan® customizados (Applied Biosystems, Foster City, EUA): C_1971047_1_, C_1971046_10, C_8685532_20,

C_1444411_10 e C_26524724_10 respectivamente. Para validar a genotipagem, 10% das amostras foram escolhidas aleatoriamente e re-genotipadas.

4.6 Análise da expressão dos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL*

O RNA total foi isolado das células mononucleares do sangue periférico utilizando os kits Illustra Triple Prep (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido), imediatamente após a coleta das amostras. O cDNA foi obtido utilizando o kit High Capacity cDNA transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

A integridade do RNA 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*. 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). O RNA total foi quantificado (A260nm) e teve seu grau de pureza (A260/A280) avaliado por meio de espectrofotometria no ultravioleta, através do espectrofotômetro ND-1000 (NANODROP technologies Inc, Wilmington, DE, EUA).

A síntese do cDNA a partir do RNA total foi realizada utilizando-se o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* fornecido pela *Applied Biosystems®* (Foster City, CA, EUA), de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante em termociclador *MyCycler™* (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.

Antes de iniciar a avaliação da expressão dos genes alvo foi realizada a 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). 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). 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.

GENES	INICIADORES	FRAGMENTOS
	5' GCGTCCCCCAACTTCTTA 3'	
18S	5' GGGCATCACAGACCTGTTATTG 3'	76 pb
	5' FAM TGGCGTTCAGCCACCCGAGATT TAMRA 3'	
	5' ATTTGGGTCGCAGTTCTTG 3'	
UBC	5' TGCCTTGACATTCTCGATGGT 3'	133 pb
	5' FAM GTGATCGTCACTTGACAA TAMRA3'	
	5' TGGCACCACACCTTCTACAATG 3'	
β-actina	5' TCTCAAACATGATCTGGGTCATCT 3'	121 pb
	5' FAM CACCCCGTGCTGCTGACCGA TAMRA 3'	
	5' GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA 3'	
GAPDH	5' CTGGAAGATGGTGATGGGATTTC 3'	229 pb
	5' VIC CATGGCACCGTCAAGGCTGAGAACG TAMRA 3'	

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 β -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.

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

A expressão do RNAm dos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL* foi avaliada pela PCR em tempo real. Os iniciadores e as sondas foram desenhados utilizando o Primer Express[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e sintetizados pela Integrated DNA Technology (EUA) e Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA), respectivamente (**TABELA 3**). A expressão relativa foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (24) e os resultados foram expressos em vezes de variação em relação aos valores médios do grupo NG.

TABELA 3 – Iniciadores e sondas utilizados para a avaliação da expressão dos genes estudados

Genes	Iniciadores e sondas	Tamanho
<i>RANK</i>	5' ACACAGTGTGCAAACCTTGCCT3' 5'AAGAACTGCAAACCGCATCGGA3' FAM-CCGCCTGCTGACACCGTCCTCACT-TAMRA	145 pb
<i>RANKL</i>	5'TATCGTTGGATCACAGCAC3' 5'GACTCACTTTATGGGAACCA3' FAM-AACCAGCATCAAATCCCAAGTTCGCA-TAMRA	153 pb
<i>OPG</i>	5'TGCAGCGGCACATTGG3' 5' TCCCACCTTTCTTTCCCGGTAA3' FAM - ACCTCA CCT TCGAGCAG – MGB	145 pb

4.7 Análises estatísticas

Inicialmente, foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para determinar se as variáveis quantitativas poderiam ser consideradas normais. As diferenças entre os grupos de variáveis com distribuições consideradas normais foram calculadas com o teste t e ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey. Para as comparações entre os grupos das variáveis com distribuição não-normal foram aplicados os testes de Mann Whitney e Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. As análises de correlação foram realizadas pelos testes de Spearman ou Pearson. O teste qui-quadrado foi utilizado para testar as associações entre os polimorfismos e os grupos de estudo. Estas análises foram realizadas utilizando o programa SigmaStat versão 3.5 (Systat software, Erkrath,

Germany). Análises de regressão logística foram realizadas para avaliar o efeito das variáveis genéticas e não-genéticas associadas com o DM1 e a osteopatia diabética. Esta parte das análises foi realizada pelo pacote SNPAssoc do programa R versão 2.15.2 (R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) (<http://cran.r-project.org/web/packages/SNPAssoc/index.html>). Os testes com valores de p inferiores a 0,05 foram considerado significativos.

5. ARTIGOS PRODUZIDOS

5.1 O artigo “ASSOCIATION OF *OPG* GENE POLYMORPHISMS WITH LOW BONE MASS FOR CRONOLOGICAL AGE IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH TYPE 1 DIABETES” foi submetido para publicação no periódico Diabetes Research and Clinical Practice que possui fator de impacto 2,536 e Qualis B1 da CAPES para área de Medicina II.

ASSOCIATION OF OPG GENE POLYMORPHISMS WITH LOW BONE MASS
FOR CRONOLOGICAL AGE IN CHILDREN AND ADOLESCENTES WITH
TYPE 1 DIABETES

Melina Bezerra Loureiro^a, Marcela Abbott Galvão Ururahy^a, Karla Simone Costa de Souza^a, Yonara Monique da Costa Oliveira^a, Heglayne Pereira Vital da Silva^a, Raul Hernandes Bortolin^a, Francisco Paulo Freire-Neto^b, Rosário Dominguez Crespo Hirata^c, José Jorge Maciel-Neto^d, Ricardo Fernando Arrais^e, Maria das Graças Almeida^a, Mario Hiroyuki Hirata^c, Adriana Augusto de Rezende^{a*}

(a) Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

(b) Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

(c) Department of Clinical and Toxicological Analyses, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

(d) Department of Radiology, UFRN, Natal, RN, Brazil

(e) Department of Pediatrics, UFRN, Natal, RN, Brazil

Corresponding author:

Adriana Augusto de Rezende

Av. General Gustavo Cordeiro de Farias, S/N, Faculdade de Farmácia,
Petrópolis, CEP: 59022-200

Natal, Rio grande do Norte, Brazil

Tel: +55 84 3342-9807

Fax: +55 84 3342-9833

e-mail: adrirezende@yahoo.com

ABSTRACT

Aim: In this study we investigate if the OPG 1181G>C (rs2073618) and 163A>G (rs3102735) polymorphisms were associated with bone alterations in children and adolescents with T1D.

Methods: Genotyping of OPG 1181G>C and 163A>G polymorphisms were performed by allelic discrimination in 119 children and adolescents with T1D and 161 individuals without diabetes (normoglycemic - NG) aged 6 to 20 years old. Glycemic control, laboratorial parameters of bone metabolism and bone mineral density (BMD) were evaluated. Studying only T1D patients, we evaluated the polymorphisms association with biochemical parameters and BMD in various genetic models.

Results: T1D patients showed poor glycemic control, and total calcium and CTX decreased values when compared to NG subjects ($p<0.05$). BMD was lower in T1D when compared to NG subjects ($p<0.05$). Of the 119 T1D patients studied, 13 (11%) showed “low bone density for chronological age” and had poor glycemic control at the time that the samples were collected. Genotype and allele frequencies in T1D patients were not significantly different from NG for all polymorphisms. When evaluating only T1D patients, the genotypes did not influence in the bone biomarkers and BMD.

Conclusion: No association was found between 1181G>C and 163A>G polymorphisms in OPG gene in children and adolescents with low bone mass for chronological age in a Brazilian group.

Key-words: Type 1 diabetes, bone biomarkers, bone density, OPG polymorphisms

INTRODUCTION

Type 1 diabetes mellitus (T1D) and bone loss are diseases that compromise the quality of life and survival of the individual. Some studies evidence the presence of a reduced bone mineral density (BMD) in patients with T1D. These studies have showed low BMD, postponed attainment of bone mass peak, increased risk for osteoporosis and bone-related complications later in life in these patients [1–3].

The underlying mechanisms triggering the changes in BMD in patients with T1D are not well known yet. However, the RANK/RANKL/OPG system plays an important role of regulating bone metabolism, affecting the pathway of osteoclast formation and activity [4].

Osteoprotegerin (OPG) is a glycoprotein member of the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily, first identified in 1997, that acts as an important regulatory molecule in the vasculature, mainly in bone. Also known as osteoclastogenesis inhibitory factor, OPG was originally described as an inhibitor of bone resorption. This effect is due to the binding and neutralization of the receptor activator of the nuclear factor- κ B (RANK) to its ligand RANKL, thereby negatively regulating osteoclast differentiation, activity, and survival [5]. In this way, polymorphisms in OPG gene might influence bone metabolism and BMD [5,6].

Data from the literature indicates that OPG is considered to be one of the most important candidate genes for influencing the pathogenesis of osteopathy [5–7]. Although several studies have investigated the association of OPG single

nucleotide polymorphisms (SNPs) such as 163A>G, 1181G>C, 245T>G and 950T>C with BMD and bone disorder [5,6,8–10], up to date, no one has evaluated the relationship of 1181G>C and 163A>G SNPs of OPG gene with T1D and BMD.

Therefore, the aim of the present study was to investigate the association between 1181G>C and 163A>G polymorphisms of OPG with alterations on BMD and bone biomarkers. Furthermore, we also assessed the association of these polymorphisms with T1D.

METHODS

Study subjects

This cross-sectional study included 119 individuals diagnosed with T1D according to American Diabetes Association [11], aged 6 to 20 years old and under insulin therapy, recruited at the Endocrinology Pediatrics Unit, Pediatrics Hospital of the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), in Natal, RN, Brazil. All the individuals with T1D, who attended this Endocrinology Pediatrics Unit from January/2010 to June/2011, were invited to participate of the study. A group of normoglycemic and non-diabetic (NG, n=161) were recruited in local public schools. Exclusion criteria, for both groups, were other inflammatory diseases, evidence of systemic illnesses that would affect BMD, infections and pregnancy. The University Hospital Onofre Lopes (UFRN) Human Research Ethics Committee approved the study. All the study participants or their parents provided written informed consent prior to enrolment. After assessing medical

history, fasting blood samples were obtained from all subjects for biochemical analyses and genotyping.

Biochemical measurements

Glycemic control was assessed by glycated hemoglobin in total blood and fasting serum glucose. Biomarkers of bone metabolism as alkaline phosphatase (ALP) and bone alkaline phosphatase (b-ALP) activities, and type 1 collagen C-telopeptide (CTX), as well as, total and ionized calcium, and phosphorus were measured. Glycated hemoglobin, glucose, ALP activity, total calcium and phosphorous tests were performed using LABTEST kits (Lagoa Santa, Brazil) and LABMAX PLENNO equipment (LABTEST, Lagoa Santa, Brazil), except for glycated hemoglobin, which was measured using RA 50 spectrophotometer (Bayer Diagnostics, Dublin, Ireland). b-ALP activity was determined by a chemiluminescent method in Liaison equipment (DiaSorin-Diagnostics, EUA), CTX was measured by electrochemiluminescence immunoassay method using Modular equipment (Modular Analytics, E170 Modular; Roche, Mannheim, Alemanha) and serum ionized calcium was measured using an electrolyte analyzer AVL (Roche, Georgia, USA).

BMD measurements

Each participant had BMD determined at the lumbar spine (L1–L4) by dual energy radiographic absorptiometry (DEXA) using a LUNAR-GE DPX-NT bone densitometer (Lunar Radiation Corporation, USA). The assessed parameters included bone area (BA, cm²), bone mineral content (BMC, g) and BMD (g/cm² or Z-score). In order to minimize the influence of already established height,

weight and puberal development, a predicted mathematical model for BMD correction was applied, obtaining an adjusted BMD expressed in SD (Z-score). Lumbar spine DEXA was preferred because of the lower radiation doses used and lower cost, as well as, because it is a fast method.

According to the criteria set by the Brazilian Society of Bone Densitometry for the definition of decreased bone mineral density, the term "osteoporosis" should not be used in children and adolescents, considering only densitometric criteria. Thus, the terminology "low bone mass for chronological age" may be more appropriately used to characterize those individuals with z-score lower than -2.0 [12].

Genotyping

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by discontinuous Ficoll-Hipaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gradient, specific density 1.070g/mL, at room temperature. Subsequently, genomic DNA was obtained using the commercial kit Illustra Triple Prep (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) according to the manufacturer's instruction. DNA was stored at -20°C until the time of analysis.

TaqMan® allelic discrimination was performed on a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) for genotyping OPG 1181G>C (rs2073618) and OPG 163A>G (rs3102735) polymorphisms. These polymorphisms were detected using Applied Biosystems TaqMan® pre-designed assays C_1971047_1_ and C_1971046_10, respectively. To validate the genotyping, 10% of the samples chosen randomly were re-genotyped.

Statistical analyses

The Kolmogorov-Smirnov test was performed to determine whether the quantitative variables could be considered normally distributed. Differences between groups of variables with distributions considered normal were calculated with t test and ANOVA followed by Tukey multicomparison test. For group comparisons of the skew-distributed variables, Mann Whitney and Kruskal-Wallis followed by Dunn's tests were applied. Correlation was assessed by the Spearman's or Pearson's rank tests. The Chi-square test was used to test for associations between polymorphisms and study groups. These analyses were performed using SigmaStat software version 3.5 (Systat software, Erkrath, Germany). This part of statistical analyses was performed by the SNPAssoc package from the statistical software R version 2.15.2 (R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) (<http://cran.r-project.org/web/packages/SNPAssoc/index.html>). Tests with p-values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Clinical and Biochemical data

Table 1 shows biochemical and clinical data for NG and T1D groups. No difference in chronological age and gender was found between groups. As expected, serum glucose and glycated hemoglobin values were significantly higher ($p < 0.001$) in the diabetic group compared to NG. No difference was found for ionized calcium, phosphorus, ALP and b-ALP between T1D and NG subjects.

Total calcium and CTX were significantly lower in T1D patients when compared to NG individuals ($p=0.002$ and $p=0.023$, respectively). ALP showed negative correlation with time of diagnosis ($r = -0.35$, $p=0.01$) and glycated hemoglobin ($r = -0.30$, $p=0.026$).

Bone mineral densitometry data

BMD, expressed as Z-score, was lower in T1D group in comparison with NG group ($p<0.001$) as showed in Table 1. In an effort to understand the relationship between poor glycemic control and bone density in T1D, a correlation analysis was performed. Significantly negative correlation was observed between BMD and glucose ($r = -0.28$, $p=0.029$). Ionized calcium was significantly and negatively correlated to BMD ($r = -0.29$, $p=0.04$).

Interestingly, of the 119 T1D patients studied, 13 (11%) showed “low bone density for chronological age” (with BMD -2.0 ± 1.8) and had poor glycemic control at the time that the samples were collected (Glucose: 205.5 ± 126.7 mg/dL and Glycated hemoglobin: $10.6 \pm 3.1\%$). The average age of these patients was 13.0 ± 4.5 years, and the age at diagnosis was 7.9 ± 2.9 years and time of diagnosis $3.5 [1.1-5.3]$ years of diabetes.

OPG polymorphisms in T1D and NG groups

Hardy-Weinberg equilibrium was verified for the two studied polymorphisms in NG and T1D groups. Re-genotyped samples, confirmed previously established genotypes with no discrepancies. Table 2 shows genotypic and allelic distributions for OPG 1181G>C and OPG 163A>G polymorphisms. For the allelic distribution of the OPG 1181G>C, we found

although with a limited significance ($p=0.054$) that the allele C was less frequent in T1D group. No association was found when analyzing the polymorphisms according to the genetic model. The genetic models with the lower p-values for each studied polymorphism are presented (Table 3).

In order to investigate the relationship of each polymorphism with bone alterations, since the number of patients with altered BMD was not great enough to establish a group, we evaluated markers of glycemic control and bone biomarkers in the T1D subjects according to the genotypes (Table 4). For the OPG 1181G>C polymorphism, the ionized calcium was significantly increased ($p=0.036$) in the CC carries when compared to GG+GC carries.

DISCUSSION

In this study, T1D patients showed a poor glycemic control, and were therefore subjected to a higher risk of developing diabetic complications, such as osteopathy. Studies demonstrated that prolonged exposure to hyperglycemia can promote changes in bone turnover, mainly in bone formation, leading to a decrease in bone mass which can result in short-term bone fragility and osteopenia/osteoporosis. Diabetes during pubertal growth will foster a deficiency in bone mass gain, thus achieving a bone mass peak smaller than that of healthy individuals, and may impair growth and increase the risk for osteoporosis in adult age [13–15].

The pathogenesis of diabetic osteopathy is not completely understood. However, it seems reasonable to suppose that metabolic, hormonal and genetic

factors are involved in the genesis of this complication [15]. Thus, biochemical bone markers can provide insight into the pathophysiology of bone turnover [4].

In our investigation, decreased CTX concentrations may suggest a deficit in collagen synthesis, leading to an impaired bone formation, and, consequently to an imbalance of bone homeostasis. This alteration can be related to a longtime exposure to hyperglycemia in T1D patients, affecting bone turnover. Literature reports that in young T1D patients, CTX seems negatively related to pubertal development suggesting that bone resorption is impaired in T1D [16,17].

The fact that bone development occur in parallel with the presence of diabetes may induce fragility and a reduced peak bone mass in those patients. This is supported by the inverse correlation between BMD and serum glucose in T1D group, as well as, by the negative correlation between ionized calcium and BMD. Is important to note that among the 119 diabetic subjects studied, about 11% already had loss bone mass. In this way, these individuals presented low bone density for chronological age with a probable bone microarchitecture fragility with higher risk to fractures and lower peak bone mass.

Moreover, the negative correlation of ALP with glycated hemoglobin and time of diagnosis in T1D group support that chronic hyperglycemia could lead to suppressed bone turnover and thus potentially fragile bones.

Data on bone density in T1D are still scarce and controversial. While the present findings are in agreement with few previous studies [13–15], others found no significantly lower BMD in individuals with T1D when compared to their controls [16,18–21]. Some researchers had limitations, such as sample sizes not

big enough to draw definitive conclusions regarding BMD during puberty. According to study of Brandão et al (2007), children and adolescents with DM1 have normal bone mass in the lumbar spine. However, they demonstrated that longer diabetes duration and poor metabolic control may have a negative impact on bone mass, requiring further investigation through longitudinal studies. In agreement with our results Gunczeler et al (2011) suggest that T1D in children is associated with low bone turnover resulting in a deficit in bone mass which may be manifested as osteopenia in the growing bone.

Many previous studies reported that genetic factors play key roles in the pathogenesis of osteopathy and low BMD. OPG gene have been verified as being involved in bone remodeling, bone mineral homeostasis, and bone matrix composition [9]. However, up to date, no published studies have been done to evaluate the relationship of 1181G>C and 163A>G SNPs of OPG gene with BMD in children and adolescents with T1D, despite these polymorphisms are associated with loss of bone mass [7,22]. Accordingly our results about OPG polymorphisms, considering T1D group only, decreased levels of ionized calcium was found for CC genotype carriers for OPG 1181 G>C polymorphism, when compared to GG+GC genotypes carriers, suggesting that this polymorphism may be favoring an imbalance in bone homeostasis. This result can be supported when it was observed that the decrease in total calcium in T1D group can be associated with an organic attempt to reestablish bone homeostasis. Moreover, the negative correlation of ALP with glycated hemoglobin and time of diagnosis in

T1D group support that chronic hyperglycemia could lead to suppressed bone turnover and thus potentially fragile bones.

In order to elucidate the true contribution of OPG polymorphisms to bone alterations development in T1D, further studies with a larger sample of patients will improve our understanding of the contribution of this and other genes to bone mass status and allow preventive and/or therapeutic interventions in T1D.

In conclusion, this is the first study to investigate the association of OPG 1181G>C and 163A>G polymorphisms with T1D in a group of Brazilian patients. Despite no association was found, OPG remain a possible candidate gene for alterations in bone metabolism. A fine mapping and functional studies will be needed to identify the causal variants and to determine their effects on osteoporosis at the molecular, cellular, and disease levels.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to the technical support provided by students from the LABMULT/UFRN/RN. We thank all the physicians, nurses, and hospital staff at HOSPED/UFRN who were involved in the study. The authors, also, thank all children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes and their parents who gave their consent and participated in the study. This study was supported by grants from CNPq (620099/2008-9). M.H.H., R.D.C.H. and J.F.B. are recipients of fellowships from CNPq, Brazil. M.B.L, M.A.G.U. and K.S.C.S. were recipients of fellowships from CAPES, Brazil.

REFERENCES

- [1] Alexopoulou O, Jamart J, Devogelaer JP, Brichard S, de Nayer P, Buysschaert M. Bone density and markers of bone remodeling in type 1 male diabetic patients. *Diabetes Metab* 2006;32:453–8.
- [2] Hamann C, Kirschner S, Günther K-P, Hofbauer LC. Bone, sweet bone--osteoporotic fractures in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2012;8:297–305.
- [3] Loureiro MB, Ururahy M a G, Freire-Neto FP, Oliveira GHM, Duarte VMG, Luchessi AD, 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 Res Clin Pract* 2014;103:452–7.
- [4] Pater A, Sypniewska G, Pilecki O. Biochemical markers of bone cell activity in children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* n.d.;23:81–6.
- [5] Wang Q, Chen Z, Huang Y, Li Q, Zhu L, Cai X, et al. The relationship between osteoprotegerin gene polymorphisms and bone mineral density in Chinese postmenopausal women. *Int Immunopharmacol* 2013;17:404–7.
- [6] Guo L, Tang K, Quan Z, Zhao Z, Jiang D, Library C. Association Between Seven Common OPG Genetic Polymorphisms and Osteoporosis Risk: 2014;33:29–39.
- [7] Song JF, Jing ZZ, Hu W, Su YX. Association between single nucleotide polymorphisms of the osteoprotegerin gene and postmenopausal osteoporosis in Chinese women. *Genet Mol Res* 2013;12:3279–85.

- [8] Feng G, Meng L, Wang H, Lu Y, Jia J, Zhang Y, et al. Single-nucleotide polymorphism of the osteoprotegerin gene and its association with bone mineral density in Chinese postmenopausal women. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2012;25:1141–4.
- [9] Liu S, Yi Z, Ling M, Shi J. Association between g.19163A>G and g.23298T>C genetic variants of the osteoprotegerin gene and bone mineral density in Chinese women. *Hormones (Athens)* 2013;12:578–83.
- [10] Yu F, Huang X, Miao J, Guo L, Tao D. Association between osteoprotegerin genetic variants and osteoporosis in Chinese postmenopausal women. *Endocr J* 2013;60:1303–7.
- [11] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes Care* 2013;36:S11–S66.
- [12] Zerbini CAF, Pippa MGB, Eis SR, Lazaretti-castro M. Densitometria Clínica – Posições Oficiais 2006 Clinical Densitometry – Official Positions 2006. *Rev Bras Reum* 2007;25–33.
- [13] Gunczler P, Lanes R, Paz-Martinez V, Martinis R, Esaa S, Colmenares V, et al. Decreased Lumbar Spine Bone Mass and Low Bone Turnover in Children and Adolescents with Insulin Dependent Diabetes Mellitus Followed Longitudinally. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1998;11:413–9.
- [14] Loureiro M, Ururahy M. Low bone mineral density is associated to poor glycemic control and increased OPG expression in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Res ...* 2014.

- [15] Gogas Yavuz D, Keskin L, Kiyıcı S, Sert M, Yazıcı D, Sahin I, et al. Vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI, TaqI polymorphisms and bone mineral density in a group of Turkish type 1 diabetic patients. *Acta Diabetol* 2011;48:329–36.
- [16] Brandao FR, Vicente EJ, Daltro CH, Sacramento M, Moreira A, Adan L. Bone metabolism is linked to disease duration and metabolic control in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;78:334–9.
- [17] Starup-Linde J. Diabetes, biochemical markers of bone turnover, diabetes control, and bone. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:21.
- [18] Maggio a BR, Ferrari S, Kraenzlin M, Marchand LM, Schwitzgebel V, Beghetti M, et al. Decreased bone turnover in children and adolescents with well controlled type 1 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2010;23:697–707.
- [19] Simmons JH, Raines M, Ness KD, Hall R, Gebretsadik T, Mohan S, et al. Metabolic control and bone health in adolescents with type 1 diabetes. *Int J Pediatr Endocrinol* 2011;2011:13.
- [20] De Amorim FPLG, Ornelas SS, Diniz SF, Batista AC, da Silva TA. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. *J Mol Histol* 2008;39:401–8.
- [21] Bechtold S, Dirlenbach I, Raile K, Noelle V, Bonfig W, Schwarz HP. Early manifestation of type 1 diabetes in children is a risk factor for changed bone geometry: data using peripheral quantitative computed tomography. *Pediatrics* 2006;118:e627–34.

[22] Shang M, Lin L, Cui H. Association of genetic polymorphisms of RANK, RANKL and OPG with bone mineral density in Chinese peri- and postmenopausal women. *Clin Biochem* 2013;46:1493–501.

Table 1

Biochemical and clinical data for NG and T1D

Variables	NG <i>n=161</i>	T1D <i>n=119</i>	p-value
Sex, <i>female</i> %	61,5	73,1	0.967
Age, <i>years</i>	11(9-15)	13 (9-15)	0.379
Time of diagnosis, <i>years</i>	-	5.0 ± 3.7	-
Age at diagnosis, <i>years</i>	-	6.9 ± 3.5	-
Glucose, <i>mg/dL</i>	79 (73.5-85.5)	210 (131-316)	<0.001
Glycated hemoglobin, %	5.8 (5.1-6.7)	9.5 (7.8-12.3)	<0.001
Ionized Ca, <i>mmol/L</i>	1.2 (0.8-1.2)	1.1(0.9-1.2)	0.808
Ca, <i>mg/dL</i>	10 (9.3-10.8)	9.6 (8.8-10.3)	0.002
Phosphorus, <i>mg/dL</i>	4.6 ± 1.1	4.4 ± 1.3	0.191
ALP, <i>U/L</i>	234.9 ± 133.7	253.9 ± 122.2	0.215
b-ALP, <i>µg/L</i>	68.4 ± 39.5	75.7 ± 39.2	0.390
CTX, <i>ng/mL</i>	1.1 ± 0.5	0.9 ± 0.5	0.023
BMD, <i>Z-score</i>	0.2 ± 0.9	-0.8 ± 1.2	<0.001

Results are shown as mean ± standard deviation or median (interquartile range), unless otherwise indicated. Significant p-values are shown in bold. NG, normoglycemic; T1D, Type 1 diabetes; ALP, alkaline phosphatase; b-ALP, bone alkaline phosphatase; CTX, type 1 collagen C-telopeptide; BMD, bone mineral density.

Table 2

Frequencies of genetic polymorphisms in T1D and NG subjects

Polymorphism	Genotype/Allele	NG n (%)	T1D n (%)	p-value
<i>OPG 1181 G>C</i> (rs2073618)	GG	59 (36.6)	47 (39.5)	0.888
	GC	75 (46.6)	53 (44.5)	
	CC	27 (16.8)	19 (16.0)	
	G	145 (52,9)	147 (85)	0.054
	C	129 (47,1)	91 (15)	
<i>OPG 163 A>G</i> (rs3102735)	AA	112 (72.3)	84 (71.8)	0.960
	AG	41 (26.5)	31 (26.5)	
	GG	2 (1.3)	2 (1.7)	
	A	265	199	0.983
	G	45	35	

 NG, normoglycemic; T1D, Type 1 diabetes.

Table 3

Genotype distribution of polymorphisms in the studied groups according to the genetic model

Polymorphism	Genetic model	NG n (%)	T1D n (%)	OR (95% CI)	p-value
<i>OPG 1181 G>C</i> (rs2073618)	<i>Recessive</i>				
	GG+GC	134 (83.2)	100 (84.0)	1	0.857
	CC	27 (16.8)	19 (16.0)	0.94 (0.5-1.79)	
<i>OPG 163 A>G</i> (rs3102735)	<i>Recessive</i>				
	AA+AG	153 (98.7)	115 (98.3)	1	0.777
	GG	2 (1.3)	2 (1.7)	1.33 (0.18-9.59)	

Significant p-values are shown in bold. The genetic models with the lower p-values for each studied polymorphism are presented.

NG, normoglycemic; T1D, Type 1 diabetes; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

Table 4

Biochemical parameters according to the studied polymorphisms genotypes in T1D patients

Polymorphisms	Glucose mg/dl	Glycated Hemoglobin %	Ionized calcium Mmol/L	Calcium mg/dL	Phosphorus mg/dL	ALP U/L	Bone ALP µg/L	CTX ng/mL	BMD Z-score
<i>OPG 1181 G>C</i> (rs2073618)									
<i>Recessive</i>									
GG+GC	227.8 ± 111.6	9.5 (7.9-11.6)	1.0 (0.8-1.2)	9.7 (8.8-10.6)	4.3 (3.7-4.9)	229.6 (154.0- 350.0)	69.0 (25.2-106.9)	0.6 (0.4-0.9)	-0.7 ± 1.2
CC	228 ± 118.8	10.3 (7.6-13.5)	1.2 (1.0-1.2)	9.4 (8.8-10.1)	4.0 (3.6-4.9)	203 (150.0-228.2)	82.1 (33.7-105.8)	0.9 (0.7-1.2)	-1.4 ± 1.3
p-value	0.995	0.673	0.036	0.414	0.218	0.130	0.821	0.200	0.125
<i>OPG 163 A>G</i> (rs3102735)									
<i>Dominant</i>									
AA	226.7 ± 111.3	9.7 (7.8-12)	1.0 ± 0.2	9.6 (8.7-10.6)	4.3 (3.6-4.9)	211 (159.4-322.4)	69 (22.9-88.7)	0.6 (0.4-1.0)	-0.9 ± 1.0
AG+GG	221.7 ± 114.3	9.4 (8.3-11.9)	1.0 ± 0.2	9.9 (9.3-10.3)	4.1 (3.8-4.8)	207.8 (145.2-336)	113.2 (40.3-120.0)	0.7 (0.4-0.9)	-0.5 ± 1.5
p-value	0.834	0.958	0.344	0.274	0.879	0.586	0.051	0.659	0.291

Results are shown as mean ± standard error or median (interquartile range). Significant p-values are shown in bold.

ALP, alkaline phosphatase; b-ALP, bone alkaline phosphatase; CTX, type 1 collagen C-telopeptide; BMD, bone mineral density.

6. COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E CONCLUSÕES

O projeto inicial foi intitulado: “Estudo da associação dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* com a osteopatia diabética”. O objetivo principal era estudar a associação do polimorfismo e da expressão dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* com o diabetes tipo 1 e a osteopatia diabética. Tal objetivo, foi alcançado ao longo do estudo.

Este projeto fez parte de um estudo maior que foi aprovado pelo CNPq (Edital nº 16/2008 – Casadinho), o qual tinha como título “Avaliação dos marcadores moleculares e imunomoduladores na fisiopatologia do diabetes e suas complicações Clínicas”. O projeto Casadinho foi desenvolvido em parceria com a Universidade de São Paulo (USP/SP), o que permitiu a constante troca de informações e discussões entre o nosso grupo de pesquisa e os grupos dos professores Mario Hiroyuki Hirata, Rosario Dominguez Crespo Hirata e Dulcinéia Saes Parra Abdalla, permitindo assim um enriquecimento ainda maior do nosso conhecimento.

Quanto à contribuição científica do projeto como um todo obteve-se 3 defesas de mestrado, além de 1 artigo aceito, 2 submetidos, 2 em fase final de formatação para envio e 3 em preparação. Além disso, 12 resumos de trabalhos publicados em congressos nacionais e internacionais, 1 menção honrosa e 1 prêmio de melhor trabalho na categoria de Ciências Clínicas no 21st Annual Fellows Research Forum da National Kidney Foundation. Todos estes trabalhos estão pontuados logo abaixo.

O nosso estudo contribuiu de forma importante para o entendimento dos fatores que estão associados ao desenvolvimento do diabetes tipo 1 e da osteopatia diabética, visto que há um esforço mundial na busca da elucidação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do diabetes e suas complicações. Uma vez que a origem étnica e geográfica da população influencia na frequência de polimorfismos genéticos, o fato de este estudo ser,

pelo que sabemos o primeiro a avaliar a associação destes polimorfismos estudados em indivíduos com DM1 no Brasil o torna ainda mais valioso.

O doutorado resultou em um aprofundamento científico e intelectual, adquirido através do aprendizado de novas técnicas,; do estudo em disciplinas, como Bioética e Redação de Trabalho Científico, entre outras que nos proporcionou um amadurecimento científico e da discussão de artigos em nosso grupo de pesquisa.

Substituímos técnicas, selecionamos e delimitamos genes, contudo, todas as metas foram alcançadas devido ao comprometimento e dedicação dos alunos de iniciação científica, mestrados e doutorandos integrantes do LABMULT/LABIOMOL da UFRN e de todos os nossos colaboradores. Nossa perspectiva quanto ao projeto é continuar o estudo da associação dos genes *RANK*, *RANKL* E *OPG*, buscando a utilização de metodologias como as dos estudos de microarranjo; e incluir uma maior quantidade de indivíduos e fazer um acompanhamento mais prolongado destes indivíduos com o intuito de confirmar os resultados.

Ainda neste período de doutorado, pude adquirir experiência como professora substituta, também na UFRN, atuando nas disciplinas de Parasitologia Clínica, Fundamentos em Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, Bioquímica Clínica, Estágio II e Imunologia Clínica desde 2011.2. Quanto á graduação, pretendo continuar lecionando, orientar alunos de iniciação científica, trabalhos de conclusão de curso e participar de projetos de pesquisa e extensão. Em relação à Pós-Graduação, iniciei atividade de docência na Especialização em Análises Clínicas da UFRN e, uma vez aprovada em concurso para professor pretendo orientar trabalhos de mestrado e doutorado.

Segue a produção técnico-científica que foi gerada pelo projeto de pesquisa:

- Participação em congressos e premiações

1. SOUZA, K. S. C.; URURAHY, M. A. G.; OLIVEIRA, Y. M. C.; **LOUREIRO, M. B.**; SILVA, H. P. V.; FREIRE NETO, F. P.; OLIVEIRA, G. H. M.; SANTOS, F. M.; ARRAIS, R. F.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.; DONADI, E. A.; ALMEIDA, M. G.; REZENDE, A. A. ASSOCIATION BETWEEN TGF-B1, IGF-1 AND HLA AND DIABETIC NEPHROPATHY IN T1DM PEDIATRIC PATIENTS FROM BRAZIL. In: **72th Scientific Sessions of American Diabetes Association, 2012**, Filadélfia. Diabetes, 2012. v. 61. p. A140-A140.
2. URURAHY, M. A. G.; SOUZA, K. S. C.; OLIVEIRA, Y. M. C.; **LOUREIRO, M. B.**; SILVA, H. P. V.; FREIRE NETO, F. P.; BEZERRA, J. F.; BORTOLIN, R. H.; DOI, S. Q.; ARRAIS, R. F.; HIRATA, R. D. C.; ALMEIDA, M. G.; HIRATA, M. H.; REZENDE, A. A. IL-1B AND TNF-A GENES MAY BE ASSOCIATED WITH MICROALBUMINURIA ONSET IN T1DM PEDIATRIC PATIENTS FROM BRAZIL. In: **72th Scientific Sessions of American Diabetes Association, 2012**, Filadélfia. Daibetes, 2012. v. 61. p. A142-A142.
3. SILVA, H. P. V.; SOUZA, K. S. C.; URURAHY, M. A. G.; OLIVEIRA, Y. M. C.; **LOUREIRO, M. B.**; BEZERRA, J. F.; OLIVEIRA, G. H. M.; SANTOS, F. M.; ARRAIS, R. F.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.; DONADI, E. A.; ALMEIDA, M. G.; REZENDE, A. A. HLA CLASS II AND IGF-1, TGF-B1 AND LRP5 POLYMORPHISMS AND THEIR ROLE IN SUSCEPTIBILITY TO TYPE 1 DIABETES. In: **72th Scientific Sessions of American Diabetes Association, 2012**, Filadélfia. Daibetes, 2012. v. 61. p. A667-A668.

4. URURAHY, M. A. G.; SOUZA, K. S. C.; OLIVEIRA, Y. M. C.; **LOUREIRO, M. B.**; SILVA, H. P. V.; ARAUJO, M.; FREIRE NETO, F. P.; BEZERRA, J. F.; ARRAIS, R. F.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.; ALMEIDA, M. G.; REZENDE, A. A.; DOI, S. Q. URINARY EXOSOMAL WT1 IS INCREASED IN T1DM PATIENTS WITH MICROALBUMINURIA. In: **AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY - KIDNEY WEEK 2012**, 2012, San Diego. Kidney Week 2012 - Onsite Program, 2012.

5. REZENDE, A. A.; **LOUREIRO, M. B.**; SOUZA, K. S. C.; URURAHY, M. A. G.; OLIVEIRA, Y. M. C.; BORTOLIN, R. H.; DOI, S. Q.; MACIEL NETO, J. J.; ARRAIS, R. F.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.; ALMEIDA, M. G. INCREASED TLR2 EXPRESSION AND BONE LOSS ONSET IN TYPE 1 DIABETES PEDIATRIC PATIENTS FROM BRAZIL. In: **European Congress on Osteoporosis & Osteoarthritis, 2012**, Bordeaux. Osteoporosis International, 2012. v. 23. p. S374-S374.

6. ARRAIS, R. F.; URURAHY, M. A. G.; **LOUREIRO, M. B.**; BEZERRA, J. F.; OLIVEIRA, Y. M. C.; ALMEIDA, M. G.; HIRATA, R. D. C.; DOI, S. Q.; HIRATA, M. H.; REZENDE, A. A. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO - 174G>C DA IL-6 COM O AUMENTO DA EXPRESSÃO DE TLR2 E TLR4 EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 1 PEDIÁTRICOS. In: **9º Congresso Brasileiro Pediátrico de Endocrinologia e Metabologia, 2011**, Ouro Preto. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 2011.

7. SILVA, H. P. V.; URURAHY, M. A. G.; **LOUREIRO, M. B.**; FREIRE NETO, F. P.; SOUZA, K. S. C.; OLIVEIRA, Y. M. C.; HIRATA, R. D. C.; DOI, S. Q.; ARRAIS, R. F.; HIRATA, M. H.; DONADI, E. A.; ALMEIDA, M. G.;

- REZENDE, A. A. ESTUDO DOS GENES DO COMPLEXO HLA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES NORTE-RIOGRANDENSES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1. In: **III SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE GENÉTICA CLÍNICA DA UFRN, 2011**, Natal. Anais do III SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE GENÉTICA CLÍNICA DA UFRN, 2011.
8. SILVA, H. P. V.; URURAHY, M. A. G.; **LOUREIRO, M. B.**; SOUZA, K. S. C.; OLIVEIRA, Y. M. C.; FREIRE NETO, F. P.; BEZERRA, J. F.; OLIVEIRA, G. H. M.; HIRATA, R. D. C.; DOI, S. Q.; DONADI, E. A.; ARRAIS, R. F.; ALMEIDA, M. G.; HIRATA, M. H.; REZENDE, A. A. HUMAN LEUCOCYTE ANTIGEN REGION AND DIABETIC NEPHROPATHY IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH TYPE 1 DIABETES OF RIO GRANDE DO NORTE, BRAZIL. In: **II INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2011**, Natal. Annals of II INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2011.
9. SOUZA, K. S. C.; URURAHY, M. A. G.; OLIVEIRA, Y. M. C.; **LOUREIRO, M. B.**; SILVA, H. P. V.; FREIRE NETO, F. P.; BEZERRA, J. F.; SANTOS, F. M.; MORAIS, L. V. F.; HIRATA, R. D. C.; ARRAIS, R. F.; ALMEIDA, M. G.; HIRATA, M. H.; REZENDE, A. A. ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN THE IGF-1, TGF-B1 AND LRP5 GENES WITH TYPE 1 DIABETES. In: **II INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2011**, Natal. Annals of II INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2011.

10. **LOUREIRO, M. B.**; URURAHY, M. A. G.; OLIVEIRA, Y. M. C.; SOUZA, K. S. C.; FREIRE NETO, F. P.; BEZERRA, J. F.; SILVA, H. P. V.; OLIVEIRA, G. H. M.; HIRATA, R. D. C.; ARRAIS, R. F.; ALMEIDA, M. G.; HIRATA, M. H.; REZENDE, A. A. STUDY OF ASSOCIATION BETWEEN OPG POLYMORPHISMS (-163 A>G; -1181 G>C) AND mRNA EXPRESSION IN TYPE 1 DIABETES PATIENTS. In: **II INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2011**, Natal. Annals of II INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2011.
11. OLIVEIRA, Y. M. C.; SOUZA, K. S. C.; SILVA, H. P. V.; URURAHY, M. A. G.; **LOUREIRO, M. B.**; OLIVEIRA, G. H. M.; MORAIS, L. V. F.; ARRAIS, R. F.; ABDALLA, D. S. P.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.; REZENDE, A. A.; ALMEIDA, M. G. STUDY OF 599 C>T POLYMORPHISM OF THE GPX1 GENE IN TYPE 1 DIABETES: IMPLICATIONS IN ANTIOXIDANT DEFENSE. In: **II INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2011**, Natal. Annals of II INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2011.
12. SILVA, H. P. V.; URURAHY, M. A. G.; **LOUREIRO, M. B.**; FREIRE NETO, F. P.; SOUZA, K. S. C.; OLIVEIRA, Y. M. C.; HIRATA, R. D. C.; DOI, S. Q.; ARRAIS, R. F.; HIRATA, M. H.; DONADI, E. A.; ALMEIDA, M. G.; REZENDE, A. A. ESTUDO DOS GENES DO COMPLEXO HLA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES NORTE-RIOGRANDENSES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1. In: **III Simpósio Internacional de Genética Clínica da UFRN, 2011**, Natal. Anais do III Simpósio Internacional de Genética Clínica da UFRN, 2011.

13. **MENÇÃO HONROSA** pelo trabalho apresentado intitulado "ESTUDO DOS GENES DO COMPLEXO HLA EM CRIANÇAS NORTE-RIOGRANDENSES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1, III **Simpósio Internacional de Genética Clínica da UFRN, 2011.**

- Tese defendida

1. Marcela Galvão Abbott Ururahy, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. PPgCSA/UFRN. Defendido em 17 de fevereiro de 2014. Título: Estudo da associação dos genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88* e citocinas pró-inflamatórias com a nefropatia diabética em pacientes com diabetes tipo 1.

- Dissertações defendidas

2. Yonara Monique da Costa Oliveira, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. PPgCF/UFRN. Defendido em 27 de fevereiro de 2012. Título: Avaliação do status antioxidante, expressão gênica e polimorfismos dos genes *SOD1*, *SOD2* e *GPx1* em crianças, adolescentes e adultos jovens com diabetes tipo 1.

3. Heglayne Pereira Vital da Silva, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. PPgCF/UFRN. Defendido em 27 de março de 2013. Título: Estudo dos genes do complexo do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) associados à susceptibilidade ao Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e suas complicações.

4. Karla Simone Costa de Souza, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. PPgCF/UFRN. Defendido em 31 de julho de 2013. Título: Estudo da associação dos genes *TGFB1*, *IGF1*, *IGF1R* e *LRP5* da via

WNT/B-Catenina com o desenvolvimento da osteopenia em pacientes com Diabetes mellitus tipo 1.

- Iniciação científica concluída

1. Heglayne Pereira Vital da Silva, Graduação em Farmácia/UFRN. Título: Estudo da expressão do mRNA de TLR2 E IL-1 β em pacientes com diabetes tipo 1.
2. Karla Simone Costa de Souza, Graduação em Farmácia/UFRN. Título: Study of IL-6 (-174G>C) polymorphism association with type 1 diabetes mellitus by RFLP and allelic discrimination tagman real-time PCR techniques.

- Lista de trabalhos publicados, submetidos, prontos para submissão e em preparo

- Artigo publicado

1. URURAHY, M. A. G. ; **LOUREIRO, M. B.** ; FREIRE NETO, F. P. ; SOUZA, K. S. C. ; ZUHL, I. ; BRANDÃO NETO, JOSÉ ; HIRATA, R. D. C. ; DOI, S. Q. ; ARRAIS, R. F. ; HIRATA, M. H. ; ALMEIDA, MARIA DAS GRAÇAS ; REZENDE, A. A. . **Increased TLR2 expression in patients with type 1 diabetes: evidenced risk of microalbuminuria.** Pediatric Diabetes, v. 13, p. 147-154, 2012.

- Artigo aceito

1. LOUREIRO, M.B.; URURAHY, M.A.G.; FREIRE-NETO, F.P.; OLIVEIRA, G.H.M.; DUARTE, V.M.G.; LUCHESSI, A.D.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C.; MACIEL-NETO, J.J.; ARRAIS, R.F.; ALMEIDA, M.G.; REZENDE, A.A. **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.13, p.452-457, 2014.

- Artigo pronto para submissão

1. **Association between HLA-DR-DQ haplotypes and genotypes with susceptibility and age at onset in type 1 diabetes patients from Rio Grande do Norte, Brazil.**

Heglayne Pereira Vital da Silva^a, Marcela Abbott Galvão Ururahy^a, Karla Simone Costa de Souza^a, **Melina Bezerra Loureiro^a**, Yonara Monique da Costa de Oliveira^a, Thamara Rodrigues de Melo^a, Gustavo Henrique de Medeiros Oliveira^a, André Ducati Luchessi^a, Janaina Cristiana de Oliveira Crispim Freitas^a, Eduardo Antônio Donadi^b, Rosário Domingues Crespo Hirata^c, Ricardo Fernando Arrais^d, Maria das Graças Almeida^a, Mario Hiroyuki Hirata^b, Adriana Augusto de Rezende^a.

^aDepartment of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil.

^bDepartment of Clinical and Toxicological Analyses, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

^cDepartment of Internal Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

^dDepartment of Pediatrics, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil.

- Artigos em preparo

1. *TGFB1*, *IGF1* AND *IGF1R* MRNA EXPRESSIONS: INFLUENCE ON BONE METABOLISM IN TYPE 1 DIABETIC PATIENTS

Karla Simone Costa de Souza^a, Marcela Abbott Galvão Ururahy^a, Yonara Monique da Costa Oliveira^a, **Melina Bezerra Loureiro^a**, Heglayne Pereira Vital da Silva^a, Francisco Paulo Freire-Neto^b, João Felipe Bezerra^a, André Ducati Luchessi^a, José Jorge Maciel Neto^c, Ricardo Fernando Arrais^d, Rosario Dominguez Crespo Hirata^e, Maria das Graças Almeida^a Mario Hiroyuki Hirata^e, Adriana Augusto de Rezende^{a,*}.

^a Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil.

^b Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil.

^c Radiology Center, Onofre Lopes University Hospital of Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil.

^d Department of Pediatrics, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil.

^e Department of Clinical and Toxicological Analysis, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

1. STUDY OF PRO198LEU POLYMORPHISM OF GPX1 AND ACTIVITY OF GLUTATHIONE PEROXIDASE IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH TYPE 1 DIABETES

Yonara M.C. Oliveira^a, Karla S.C. Souza^a, Heglayne P.V. Silva^a, **Melina B. Loureiro^a**, Marcela A.G. Ururahy^a, Rosário D.C. Hirata^b, Mário H. Hirata^b,

Dulcinéia S.P. Abdalla^b, José B. Neto^a; Adriana A. Rezende^a, Maria das Graças Almeida^a

^a Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN 59012570, Brazil

^b Department of Clinical and Toxicological Analysis, University of São Paulo, São Paulo, SP, 05508900, Brazil

7. REFERÊNCIAS

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes Care*. 2013 Jan;36(S1):S11–S66.
2. Malerbi, Domingos A., Franco LJ. Multicenter Study of the prevalence of Diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban brazilian population aged 30-69 yr. 1992;1(1):1509–16.
3. Torquato G, Foss MC. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. 2003;
4. Duarte VMG, Ramos AMO, Rezende L a, Macedo UBO, Brandão-Neto J, Almeida MG, et al. Osteopenia: a bone disorder associated with diabetes mellitus. *J Bone Miner Metab* [Internet]. 2005 Jan [cited 2013 May 13];23(1):58–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616896>
5. Hadjidakis DJ, Raptis a E, Sfakianakis M, Mylonakis a, Raptis S a. Bone mineral density of both genders in Type 1 diabetes according to bone composition. *J Diabetes Complications* [Internet]. 2006 [cited 2013 May 17];20(5):302–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949517>
6. Brandao FR, Vicente EJ, Daltro CH, Sacramento M, Moreira A, Adan L. Bone metabolism is linked to disease duration and metabolic control in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 78(3):334–9.
7. Thrailkill, K.M.; Lumpkin, C. K.; Bunn, C.R.J.; Kemp, S.F.; Fowlkes, J.L. Is insulin anabolic agent in bone? Dissecting diabetic bone for clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005.v. 289, p. E735-E745.
8. Barbosa, K B F B, Franceschini, S C C, Priore, S E. Influência dos estágios de maturação sexual no estado nutricional, antropometria e composição corporal de adolescentes. *Rer. Bras. Saúde Matern. Infant*. 2006. 6 (4): 375-382.

9. Coli, AS. Inter-relações entre características de maturação sexual em adolescentes brasileiros. *Pediatr.* 1984 6:63-68.
10. Ball, GDC, Huang, TTK, Gower, BA, Cruz, MLC, Shabi, GQ, Weigensberg, MJ, Goran, MIG. Longitudinal changes in insulin sensitivity, insulin secretion, and β cell function during puberty. *The Journal of Pediatrics.* 2006. 148:16-22.
11. Moyler-Mileur L J, Dixon S B, Quick J L, Asken E W, Murray M A Bone mineral acquisition in adolescents with type 1 diabetes. *The Journal of Pediatrics.* 2004. 145:662-9.
12. Orimo H, Haysahi Y, Fukunaga M, Sone T, Fujiwara S, Shiraki M, Kushida K, Miyamoto S, Soen S, Nishimura J, Oh-Hashi Y, Hosoi T, Gorai I, Tanaka H, Igai T, Kishimoto H Diagnostic criteria for primary osteoporosis: year 2000 revision. *J Bone Miner Metab.* 2001. 19: 331-337.
13. Boyce, BF, Xing, L. Functions of RANK/RANKL/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2008. 473:139-146.
14. Blair, JM, Dunstan, CR. RANK ligand. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2007.39:1077-1081.
15. Anderson, D.M.; Maraskovisk, E.; Billionsley, W.L.; Dougall, W.C.; Tometsko, M.E.; Roux, E. R.; Teepe, M.C.; Dubose, R.F.; Cosman, D.; Galibert, L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997. 390:175–179.
16. Theoleyre, S.; Wittrant, Y.; Tat, S.K.; Fortun, Y.; Redini, F.; Heymann, D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiology bone remodeling. *Cytokine & Growth Reviews.* 2004. v. 15, p. 457-475.
17. Fouque-Albert, A, Chapurlat, R. Influence of RANKL inhibition on immune system in the treatment of bone disease. *Joint Bone Spine.* 2008.75:5-10.

18. Choi, J. Y.; Shin, A., Park, S. K.; Chung, H. W.; Cho, S. I.; Shin, C.S.; Kim, H.; Kang, C.; Cho, D.Y.; Kang, D. Genetic polymorphism of OPG, RANK and ESR1, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* 2005. 77:152–159.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Resultados complementares

Ressaltamos que os dados referentes à expressão do RNAm (Figura 1) não foram explorados nos dois artigos apresentados anteriormente, assim como os dados referentes aos polimorfismos RANK 3'UTRC>A, RANK 575C>T, RANKL INTRON A>G (Figura 2), entretanto estes dados estão sendo analisados em conjunto com os demais com o intuito de serem alvos de uma nova publicação.

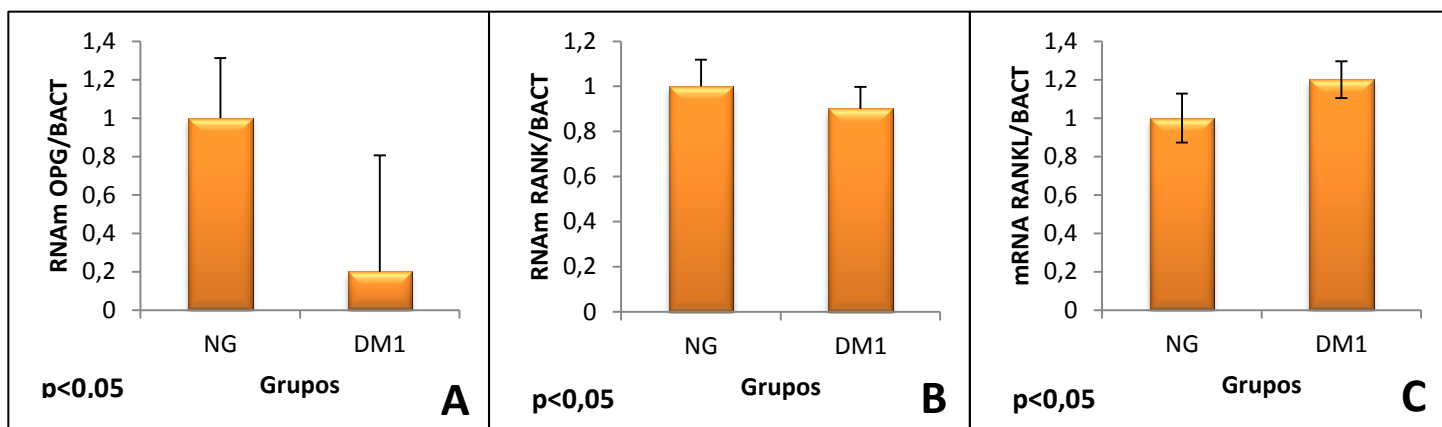


FIGURA 1 – Expressão de RNAm em PBMCs dos genes *OPG* (A), *RANK* (B) e *RANKL* (C), normalizados pela β -actina nos grupos estudados. As barras representam, o número de vezes (fold change) da expressão do RNAm nos grupos em relação à média da expressão no grupo normoglicêmico. NG: Grupo normoglicêmico; DM1: Grupo Diabetes tipo 1

Figura 2

Frequencias genóticas e alélicas dos polimorfismos estudados para os grupos NG e DM1

Polymorphism	Genotype/Allele	NG	T1D	p-value
		n (%)	n (%)	
RANK 3'UTR G>T (rs884205)	GG	105 (68.6)	83 (63.3)	0.625
	GT	38 (24.9)	39 (29.8)	0.469
	TT	10 (6.5)	9 (6.9)	
	G	248 (81.1)	205 (78.2)	
	T	58 (18.9)	57 (21.8)	
RANK 575 C>T (rs1805034)	CC	59 (38.8)	41 (31.1)	0.329
	CT	72 (47.4)	67 (18.2)	0.167
	TT	21 (13.8)	24 (18.2)	
	C	190 (62.5)	149 (56.4)	
	T	114 (37.5)	115 (43.6)	
RANKL INTRON A>G (rs9594766)	AA	46 (48.4)	37 (36.6)	0.981
	AG	35 (36.8)	50 (49.5)	0.201
	GG	14 (14.8)	14 (13.9)	
	A	127 (66.8)	192 (60.8)	
	G	63 (33.1)	124 (39.2)	

NG, normoglycemic; T1D, Type 1 diabetes

Apêndice 2 – 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 *OPG*, *RANK* e *RANKL* com a osteopatia diabética

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 (DNA, RNA e proteínas) no sangue e na urina de pacientes com diabetes tipo 1 e indivíduos saudáveis. O DNA é uma substância que está dentro da célula e que herdamos de nossos pais e transmitimos aos nossos filhos. Estudaremos determinados “pedacinhos” desse DNA (cientificamente são chamados de genes), que podem estar relacionados com o surgimento do Diabetes tipo 1 e suas complicações. Determinaremos também, através do estudo do RNA e de proteínas (substâncias produzidas a partir da molécula de DNA), a expressão destes genes (ou seja, avaliaremos os compostos produzidos por estes pedacinhos de DNA). Caso você, responsável legal, e também a própria criança/adolescente aceitem que ela participe desta pesquisa, vamos coletar uma amostra de sangue (19 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 (DNA, RNA, proteína, 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. As amostras de DNA e RNA serão enviadas para São Paulo para realização das análises sob a responsabilidade do Professor Mario Hiroyuki Hirata. Após os testes, o paciente poderá ter acesso aos resultados através dos pesquisadores envolvidos.

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).

Este projeto foi avaliado pelo Comitê de ética em pesquisa do HUOL/UFRN. Informações adicionais podem ser obtidas pelo telefone 3202-3719 ramal 276.

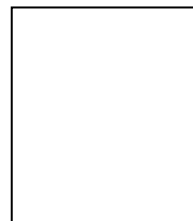
Consentimento para participação

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

Assinatura

Apêndice 3 – Ficha para coleta de dados individual

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? _____

➤ **Classificação Econômica**

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

Pontuação: _____

Classificação: _____

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ONOFRE LOPES
(CEP-HUOL)

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes (CEP-HUOL), devidamente reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/MS), analisou o projeto:

Título: Estudo da associação dos genes RANK e OPG com a osteopatia diabética.

Protocolo – 328/09.

Pesquisador Responsável: Adriana Augusto Rezende.

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, incluindo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com as diretrizes da Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, em reunião plenária realizada dia 21 de Agosto de 2009 no CEP/HUOL. Toda e qualquer alteração no projeto/protocolo de pesquisa, assim como eventos adversos que venham a ocorrer deverão ser comunicados oficialmente e imediatamente ao CEP-HUOL. O relatório final do projeto ou a cópia de sua publicação deverá ser encaminhado ao CEP/HUOL após o término do estudo, conforme cronograma, com a respectiva cópia de folha de rosto.

Natal, 24 de Agosto de 2009.

Maria Sani M. de Oliveira Paiva
Coordenadora do CEP-HUOL

