

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 *TLR2*, *TLR4*, *MYD88* E DE
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS COM A NEFROPATIA DIABÉTICA EM
PACIENTES COM DIABETES TIPO 1

MARCELA ABBOTT GALVÃO URURAHY

NATAL/RN

2014

MARCELA ABBOTT GALVÃO URURAHY

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES *TLR2*, *TLR4*, *MYD88* E DE
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS COM A NEFROPATIA DIABÉTICA EM
PACIENTES COM DIABETES TIPO 1

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

Co-orientadora: Profa. Dra. Sonia de Quateli Doi

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

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Profa. Dra. Ivonete Batista de Araújo

MARCELA ABBOTT GALVÃO URURAHY

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES *TLR2*, *TLR4*, *MYD88* E DE
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS COM A NEFROPATIA DIABÉTICA EM
PACIENTES COM DIABETES TIPO 1

Aprovada em 17/02/2014

Banca examinadora:

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

Membros da Banca: Prof. Dr. José Bruno de Almeida

Prof. Dr. André Gustavo Pires de Sousa

Prof. Dr. Luis Henrique Canani

Prof. Dr. Lídio Gonçalves

DEDICATÓRIA

A **Deus**, que em sua infinita bondade me deu a vida e uma família maravilhosa. Somente Nele por muitas vezes encontrei forças para vencer os desafios dessa jornada.

Aos **meus pais (Daisy e Luiz), minha irmã (Roberta) e meu sobrinho (Luiz Neto)**, pelo amor incondicional, pela presença em todos os momentos da minha vida, mesmo quando eu estive longe, pela força, apoio e incentivo constantes.
Amo vocês!!!

Ao meu avô Solon Galvão Filho, pelo incentivo e exemplo de profissional, de quem eu herdei o amor pelas ciências e idiomas.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Adriana Augusto de Rezende**, que ao longo destes 12 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. Sonia de Quateli Doi** por me receber de portas abertas por 1 ano em seu laboratório, acolhendo-me de forma atenciosa e orientando-me durante meu estágio de doutorado sanduíche. Pelo exemplo de profissional e pessoa, muito obrigada!

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 ele 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.

Aos professores, funcionários e alunos da Uniformed Services University que me receberam e muito auxiliaram na realização deste trabalho tirando todas as minhas dúvidas e me ajudando sempre que possível, **Amanda, Aria, Cecília, Cristina (in memorian), Don, Magali e Nancy**, saudades.

Aos **Drs. Mark Knepper, Peter Yuen, Robert Star e Trairak Psitkun**, do National Institutes of Health, por abrirem as portas do laboratório para que eu pudesse realizar parte dos experimentos, por cederem um dos anticorpos utilizados na avaliação dos exossomos urinários e pelas discussões científicas.

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, Melina, Raul, Thamara, Thaynnan, Valéria, Vinícius e Yonara.**

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

RESUMO

Os objetivos do presente trabalho foram estudar a associação de polimorfismos e da expressão do RNAm dos genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *IL1B*, *IL6* e *TNFA* com a nefropatia diabética em crianças e adolescentes com *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), assim como investigar o potencial papel do WT-1 nos exossomos urinários como um biomarcador sensível e não invasivo de dano glomerular nestes pacientes. No total, foram incluídos no estudo 144 crianças e adolescentes com DM1 e 173 indivíduos normoglicêmicos (NG) da mesma faixa etária. Foram pesquisados os polimorfismos dos genes *IL6* (-634C>G e -174G>C), *IL1B* (3954C>T e -511C>T), *TNFA* (-308G>A) e *TLR2* (1350T>C), determinadas as expressões gênicas de *IL6*, *IL1B*, *TNFA*, *MYD88*, *TLR2* e *TLR4*, e quantificado o WT-1 em exossomos urinários. Além disso, foram avaliados o controle glicêmico, os lipídios séricos e parâmetros laboratoriais de função renal. Os indivíduos com DM1 apresentaram um controle glicêmico insatisfatório e valores aumentados de colesterol total, LDL-colesterol e da relação albumina:creatinina (RAC), quando comparados com os NG ($p<0,05$). O polimorfismo *IL6* -174G>C foi associado com susceptibilidade ao DM1 ($p<0,05$). Estudando apenas os indivíduos com DM1, foi observado que os portadores do genótipo *IL6* -174CC apresentaram valores aumentados de hemoglobina glicada, RAC, colesterol total e LDL-colesterol, no modelo recessivo ($p<0,05$); já os portadores do genótipo *TNFA* -308AA apresentaram um aumento nas concentrações séricas de HDL-colesterol, também no modelo recessivo ($p<0,05$). A relação WT-1:creatinina apresentou-se significativamente aumentada nos indivíduos com DM1 e microalbuminúria quando comparados com ambos os grupos DM1 sem microalbuminúria e NG ($p<0,05$). Esses resultados sugerem que o polimorfismo *IL6* -174G>C pode contribuir para o desenvolvimento do DM1 e da nefropatia diabética e que o WT-1 nos exossomos urinários seria um indicador precoce de dano em podócitos.

Palavras-chave: Diabetes tipo 1, nefropatia diabética, expressão gênica, polimorfismos genéticos, exossomos urinários, WT-1

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALT . Alanina amino transferase
- AQP2 . Aquaporina 2
- AST . Aspartato amino transferase
- cDNA . Ácido desoxirribonucleico complementar
- Ct . Ciclo de *threshol*d
- DEPC . Dietil pirocarbonato
- DM . *Diabetes mellitus*
- DNA . Ácido desoxirribonucleico
- EDTA . Ácido etilenodiamino tetra-acético
- GAPDH . Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- HDL . Lipoproteína de alta densidade
- IL . Interleucina
- LDL . Lipoproteína de baixa densidade
- MHC . Complexo de histocompatibilidade principal
- MyD88 . Proteína 88 de resposta primária à diferenciação mielóide
- NG . Normoglicêmico
- PCR . Reação em cadeia da polimerase
- RAC . Relação albumina:creatinina
- RNA . Ácido ribonucleico
- RNA_m . Ácido ribonucleico mensageiro
- TGF . Fator de crescimento transformador
- TLR . Receptor *toll-like*
- TNF . Fator de necrose tumoral
- UBC . Ubiquitina C
- VLDL . Lipoproteína de muito baixa densidade
- WT-1 . Fator Tumoral de Wilms-1

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Expressão de RNAm em PBMCs dos genes <i>TLR2</i> , <i>TLR4</i> , <i>MYD88</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL6</i> e <i>TNFA</i>	77
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Iniciadores e sondas utilizados para a seleção do gene de referência.....	23
TABELA 2 - Estabilidade dos genes de referência testados na população de estudo, utilizando o NormFinder e o programa Genorm.....	24
TABELA 3 - Iniciadores e sondas utilizados para a avaliação da expressão dos genes estudados.....	25

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 Pesquisa de polimorfismos nos genes <i>TLR2</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL6</i> e <i>TNFA</i>	20
4.5 Análise da expressão dos genes <i>TLR2</i> , <i>TLR4</i> , <i>MYD88</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL6</i> e <i>TNFA</i>	21
4.6 Isolamento dos exossomos urinários e estudo da expressão da proteína WT-1	25
4.7 Análises estatísticas	26
5 ARTIGOS PRODUZIDOS	28
6 COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E CONCLUSÕES	59
7 REFERÊNCIAS	71
APÊNDICES	75
Apêndice 1 Ë Resultados complementares	76
Apêndice 2 Ë Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	78
Apêndice 3 Ë Ficha para coleta de dados individual	80
ANEXOS	82
Anexo 1 Ë Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa	83

1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma das mais importantes doenças crônicas que afetam a sociedade moderna. Sua incidência e prevalência têm aumentado em níveis epidêmicos nos últimos anos, o que o caracteriza como um problema de saúde pública. Além de estar associado a complicações que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência do indivíduo o DM envolve altos custos no seu tratamento (1,2).

A Associação Americana de Diabetes (1), atualmente, classifica o DM em 4 categorias clínicas: diabetes tipo 1 (DM1), associado à ausência absoluta da produção de insulina; diabetes tipo 2 (DM2), resultante de defeitos na produção e/ou ação deste hormônio; diabetes gestacional, quando o diagnóstico ocorre durante a gestação; e outros tipos específicos de diabetes, devido a outras causas, como defeitos genéticos já conhecidos.

O DM1 é uma doença multifatorial caracterizada por hiperglicemia crônica resultante da deficiência absoluta da secreção de insulina. A ausência deste hormônio é decorrente da destruição autoimune das células pancreáticas (1,2).

Indivíduos geneticamente predispostos a desenvolver o DM1 quando entram em contato com alguns fatores ambientais, como vírus e ligantes endógenos, podem ter estes fatores reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões moleculares, como os receptores *toll-like* (TLRs), presentes nas células pancreáticas. Uma vez que estes receptores são ativados, são desencadeadas diversas cascatas de sinalização intracelulares que culminam como estímulo a apresentação de antígenos via MHC (complexo de histocompatibilidade principal) de classe I, produção de espécies reativas do oxigênio e indução da sinalização apoptótica. Além disso, são produzidas quimiocinas e citocinas, que por sua vez, recrutam células imunes circulantes (macrófagos, linfócitos T e células dendríticas) tornando a inflamação local crônica que leva à morte das células pancreáticas, sendo este processo denominado insulite (3).

Alguns fatores relacionados ao DM1, como hiperglicemia, a intensa formação de produtos finais de glicação avançada e de espécies reativas de oxigênio, além de alterações hemodinâmicas e hormonais, tem ação direta nas células renais (endoteliais, mesangiais, epiteliais, tubulares e podócitos) desencadeando cascatas de sinalização intracelulares que culminam com a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão. As citocinas tem uma ação deletéria direta nas células renais. Já as quimiocinas e moléculas de adesão recrutam células inflamatórias circulantes (monócitos, linfócitos e neutrófilos) causando infiltração renal, acumulação e ativação celular, com consequente dano renal e instalação do quadro de nefropatia diabética (ND) (4).

Uma das cascatas de sinalização intracelular que pode ser desencadeada, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias é a via dos TLRs. Estes são receptores transmembrana com importante função na imunidade inata. Atualmente existem 13 TLRs descritos, e os TLR2 e TLR4 são os dois mais estudados em busca da sua relação com DM1 e suas complicações. A ativação destes receptores pode ser dependente ou independente da molécula adaptadora MyD88 (proteína 88 de resposta primária à diferenciação mielóide) e leva à produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 , IL-6 e TNF- (5).

Dados da literatura, incluindo um estudo prévio deste grupo de pesquisa, mostram expressão aumentada do RNAm de *TLR2* em pacientes com DM1 (6,7). Além disso, a expressão de RNAm de *TLRs* em rins saudáveis ou doentes é descrita na literatura. Estes receptores são encontrados tanto nas células renais intrínsecas quanto em células imunes infiltrantes. Eles modulam a resposta do rim a diversas doenças como sepse, isquemia, doenças envolvendo imunocomplexos, proteinúria e rejeição ao transplante renal (8). A presença de polimorfismos nos genes que codificam os TLRs, podem causar alterações na expressão e/ou função destes receptores, podendo levar ao desenvolvimento de doenças. Alguns estudos demonstraram a associação de polimorfismos no *TLR2* com o DM1 (9,10), podendo estes polimorfismos também estar relacionados com o desenvolvimento e/ou progressão das complicações diabéticas, dentre elas a nefropatia.

Desta forma, um possível mecanismo relacionado ao dano renal no DM1 seria via ativação de TLRs que estimulariam a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 , IL-6 e TNF-) que, por sua vez, levariam ao dano renal.

A IL-1 aumenta a permeabilidade endotelial, induz alterações na hemodinâmica glomerular, a síntese de fibronectina e TGF- e a proliferação mesangial (4,11). O aumento da expressão de IL-1B foi associado com a ND em um estudo experimental (12) e em um estudo prévio com pacientes com DM1 e microalbuminúria, foi encontrado um aumento da expressão de RNAm desta citocina (6). Além disso, relatos na literatura mostram a associação de polimorfismos nos genes que codificam esta citocina com concentrações aumentadas de glicose e hemoglobina glicada (13) e com a nefropatia diabética (14).

Já a IL-6 está associada ao aumento da permeabilidade endotelial e da síntese de fibronectina, assim como à proliferação de células mesangiais (4,11). Estudos experimentais mostraram o aumento da expressão de IL-6 em rins de diabéticos, que estão correlacionados com hipertrofia renal e excreção de albumina (15) e concentrações aumentadas de IL-6 foram observadas tanto em pacientes com DM1 quanto em pacientes com DM2 com nefropatia, sendo essas concentrações ainda mais elevadas naqueles que apresentam proteinúria quando comparados àqueles com microalbuminúria e normoalbuminúria (16,17). Alguns polimorfismos no gene *IL6* vem sendo associados tanto com a susceptibilidade ao DM1 (18,21), quanto com o desenvolvimento de complicações como a nefropatia (21,22).

O TNF- aumenta a permeabilidade endotelial, induz alterações na hemodinâmica glomerular e tem uma ação celular direta, induzindo a apoptose e a necrose (4,11). Em modelo experimental de nefropatia diabética, foi observado um aumento na expressão renal de TNF- (23) e, em pacientes com DM1 concentrações séricas elevadas de TNF- em pacientes com microalbuminúria, sendo este aumento gradativo à medida que a ND se agrava (24). Além disso, estudos vem mostrando a associação de polimorfismos no gene que codifica esta proteína com o DM1 (25,26) e com a proteção à nefropatia diabética (14).

Sendo assim, a pesquisa de polimorfismos nos genes *TLR2*, *IL1B*, *IL6* e *TNFA* podem vir a ser útil com o objetivo de utilizá-los como marcadores de susceptibilidade tanto para o desenvolvimento do DM1 quanto de suas complicações, dentre elas a nefropatia diabética.

Atualmente a albuminúria é a manifestação clínica mais precoce da nefropatia diabética que pode ser detectada de forma não invasiva. Entretanto, a albuminúria não é um marcador específico renal, uma vez que a albuminúria transitória pode ser detectada em indivíduos que não apresentam doença renal (27). Neste sentido, se faz necessária a identificação de marcadores que, isolados ou combinados com a albuminúria, poderiam melhorar a detecção da nefropatia diabética nos seus estágios mais iniciais (28).

Recentemente, o desenvolvimento de uma nova técnica para concentrar os exossomos eliminados na urina tem permitido a quantificação de pequenas concentrações de componentes celulares carregados nessas microvesículas (29).

Os exossomos urinários são pequenas vesículas extracelulares (40-100nm) e ricas fontes de biomarcadores, visto que são liberados de células de todos os segmentos do néfron, incluindo os podócitos (30), um dos alvos primários de danos no desenvolvimento da nefropatia diabética (31. 33). Além das proteínas constitutivas, essas vesículas carregam outros componentes celulares específicos, como proteínas de membrana (ex: transportadores e canais de íons) e do citoplasma (ex: fatores de transcrição) (34).

Zhou et al. (34) demonstraram que a proteína de tumor de Wilms-1 (WT-1), um fator de transcrição, está concentrado nos exossomos urinários em quantidades suficientes para permitir sua detecção. Os fatores de transcrição podem orquestrar a mobilização de diversos genes, e normalmente desempenham um papel importante no início e no desenvolvimento de muitas doenças renais (34). O WT-1 está envolvido na nefrogênese e na diferenciação de podócitos (35). Esta proteína é comumente utilizada como marcador de podócitos diferenciados e está regulada negativamente com a ocorrência de dano renal em diversas doenças glomerulares, incluindo a nefropatia diabética (36,37). Apesar da necessidade de validação em amostras maiores, é possível

sugerir que o WT-1 presente nos exossomos urinários pode vir a se tornar um biomarcador urinário valioso de dano precoce em podócitos em doenças renais crônicas.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como principais objetivos avaliar ocorrência de polimorfismos e a expressão gênica de *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *IL1B*, *IL6* e *TNFA* em crianças e adolescente com DM1, assim como investigar o potencial papel do WT-1 nos exossomos urinários como um biomarcador precoce, sensível e não invasivo de dano glomerular nestes pacientes.

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.

Uma vez 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 TLRs e toda a cascata de sinalização dos mesmos, o presente trabalho estudou polimorfismos e a expressão de RNAm de *TLR2*, *TLR4*, *MyD88* e das citocinas pró-inflamatória *IL1B*, *IL6* e *TNFA* em pacientes com DM1, em comparação a indivíduos normoglicêmicos, para estabelecer uma correlação entre estes parâmetros e o desenvolvimento da nefropatia diabética.

Além disso, a necessidade de identificar biomarcadores sensíveis e não invasivos que, isolados ou associados à albuminúria, possibilitem o diagnóstico mais precoce da nefropatia diabética torna importante o estudo do WT-1 em exossomos urinários isolados de indivíduos com DM1 com e sem microalbuminúria.

Desta forma, o presente trabalho trouxe contribuições para a elucidação dos processos envolvidos no desenvolvimento da nefropatia diabética em pacientes com DM1; além de, pelo que sabemos, ser o primeiro estudo a demonstrar o aumento do WT-1 nos exossomos urinários isolados de crianças e adolescentes diabéticas tipo 1 com microalbuminúria.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a associação de polimorfismos e da expressão do RNAm dos genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88* e de citocinas pró-inflamatórias com a nefropatia diabética em pacientes com DM1; bem como investigar o potencial papel do WT-1 como um biomarcador urinário sensível e não invasivo de dano glomerular nestes pacientes.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar as frequências genotípica e alélica dos polimorfismos dos genes *TLR2* (1350T>C), *IL1B* (3954C>T e -511C>T), *IL6* (-634C>G e -174G>C) e *TNFA* -308G>C;
- Medir a expressão do RNAm de *TLR2*, *TLR4* e *MYD88*; e das citocinas pró-inflamatórias *IL1B*, *IL6* e *TNFA* em células mononucleares do sangue periférico;
- Isolar os exossomos urinários e medir a expressão da proteína WT-1;
- Correlacionar parâmetros bioquímicos e moleculares a fim de verificar a associação de *TLR2*, *TLR4* e *MYD88*, bem como das citocinas pró-inflamatórias com a susceptibilidade, o estado inflamatório e o desenvolvimento da nefropatia em pacientes pediátricos e adolescentes com DM1.

4. MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram recrutados os pacientes com diagnóstico de DM1, com idade entre 6 e 20 anos, atendidos no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Pediatria da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), em Natal/RN no período de janeiro/2010 a junho/2011 que aceitaram fazer parte do estudo (n=144). Os indivíduos normoglicêmicos (n=173) com idade e sexo semelhantes aos diabéticos foram selecionados em escolas públicas da mesma cidade. Os critérios de exclusão foram: histórico de etilismo, fumo, outras doenças inflamatórias 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) (número de protocolo 55/2009). 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) e uma amostra isolada de urina para a realização das determinações bioquímicas e moleculares.

4.2 Amostras biológicas

Foram coletados 19mL de sangue, após jejum de no mínimo 12 horas, de todos os pacientes para a realização da extração de DNA genômico e RNA total; e para a determinação da glicemia de jejum, hemoglobina glicada, uréia, creatinina, albumina, proteína total, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), triglicerídeos, colesterol total e frações. O sangue foi fracionado em 3 alíquotas, sendo uma sem anticoagulante (determinação dos parâmetros séricos) e as demais com EDTA (avaliação genética e hemoglobina glicada).

Além da amostra de sangue, foi coletada amostra da primeira urina da manhã para o isolamento dos exossomos e a realização das dosagens bioquímicas de creatinina e albumina.

4.3 Determinação dos parâmetros laboratoriais

O controle glicêmico foi avaliado pela determinação da hemoglobina glicada em sangue total e da glicemia sérica. A relação albumina:creatinina (RAC) urinária foi realizada a partir de amostras isoladas de urina para avaliar a função renal. As concentrações séricas de ureia, creatinina, albumina e proteína total, bem como as atividades da aspartato amino transferase (AST) e da alanina amino transferase (ALT) foram determinadas para avaliar as funções renal e hepática. O colesterol total, o HDL-colesterol e os triglicerídeos séricos também foram quantificados. O LDL-colesterol e o VLDL-colesterol foram calculados pela equação de Friedwald para todos os indivíduos, uma vez que todos apresentaram concentrações de triglicerídeos inferiores a 400mg/dL. Para os testes realizados a partir das amostras de sangue/soro foram utilizados kits Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil) e o equipamento LABMAX PLENNO (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil); com exceção da hemoglobina glicada, que foi medida utilizando o espectrofotômetro RA 50 (Bayer Diagnostics, Dublin, Irlanda). As concentração urinárias de albumina e creatinina foram determinadas utilizando-se kits BioSystems Reagents and Instruments (Barcelona, Espanha) e também foram medidas no espectrofotômetro RA 50 (Bayer Diagnostics, Dublin, Irlanda).

4.4 Pesquisa de polimorfismos nos genes *TLR2*, *IL1B*, *IL6* e *TNFA*

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 *TLR2* 1350T>C (rs3804100); *IL1B* 3954C>T (rs1143634) e -511C>T (rs16944); *IL6* -634C>G (rs1800796) e -174G>C (rs1800795); e *TNFA* -308G>A (rs1800629) 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 *TLR2* 1350T>C, *IL1B* 3954C>T, *IL1B* -511C>T, *IL6* -634C>G e *TNFA* -308G>A e foram detectados utilizando ensaios TaqMan® customizados (Applied Biosystems, Foster City, EUA): C_25607727_10, C_9546517_10, C_1839943_10, C_11326893_10 e C_7514879_10, respectivamente. Para o polimorfismo *IL6* -174G>C, os iniciadores e as sondas foram desenhados utilizando o Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e sintetizados pela Integrated DNA Technology (Coralville, EUA) e Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA), respectivamente. Os iniciadores e sondas utilizados foram: sense, 5qACGACCTAAGCTGCACTTTTCC-3q anti-sense, 5q ATTGTGCAATGTGACGTCCTTT-3q sonda 1, 5qFAM-CTAGTTGTGTCTTGCCATG-MGB-3q e sonda 2, 5qVIC-TAGTTGTGTCTTGCGATG-MGB-3q Para validar a genotipagem, 10% das amostras foram escolhidas aleatoriamente e re-genotipadas.

4.5 Análise da expressão dos genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *IL1B*, *IL6* E *TNFA*

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.

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), *B-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 É Iniciadores e sondas utilizados para a seleção do gene de referência.

GENES	INICIADORES	FRAGMENTOS
18S	5qGGCGTCCCCCAACTTCTTA 3q	76 pb
	5qGGGCATCACAGACCTGTTATTG 3q	
UBC	5qFAM TGGCGTTCAGCCACCCGAGATT TAMRA 3q	133 pb
	5qATTTGGGTCGCAGTTCTTG 3q	
	5qTGCCTTGACATTCTCGATGGT 3q	
B-actina	5qFAM GTGATCGTCACTTGACAA TAMRA3q	121 pb
	5qTGGCACCACACCTTCTACAATG 3q	
	5qTCTCAAACATGATCTGGGTCATCT 3q	
GAPDH	5qFAM CACCCCGTGCTGCTGACCGA TAMRA 3q	229 pb
	5qGGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA 3q	
	5qCTGGAAGATGGTGATGGGATTTTC 3q	
	5qVIC CATGGCACCGTCAAGGCTGAGAACG TAMRA 3q	

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 *B-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
18S	0,497	0,272
<i>GAPDH</i>	1,042	0,183
<i>UBC</i>	1,808	0,179

A expressão do RNAm dos genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *IL1B*, *IL6* e *TNFA* 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^{-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	Fragmentos
<i>TLR2</i>	5qCCCTGGGCAGTCTTGAACATT 3q 5qCCCTAGGGTTTTGTAAAGATTTC 3q 5qFAM TTTATCGTCTTCCTGGTTCAAGCCCCTTTC TAMRA 3q	128 pb
<i>TLR4</i>	5qAGCGAGCCACGCATTAC 3q 5qGCCATGGCTGGGATCAGA 3q 5qFAM ATGTCTGCCTCGCGCCTGGC TAMRA 3q	107 pb
<i>MYD88</i>	5qAAGGAATGTGACTTCCAGACCAA 3q 5qACAGTGATGAACCTCAGGATGCT 3q 5qFAM CTCTCCAGGTGCCCATCAGAAGCG TAMRA 3q	128pb
<i>IL1B</i>	5qGCACGATGCACCTGTACGAT 3q 5qAGACATCACCAAGCTTTTTTGCT 3q 5qFAM ACTGAACTGCACGCTCCGGGACTC TAMRA 3q	70 pb
<i>IL6</i>	5qCGGGAACGAAAGAGAAGCTCTA 3q 5qGGCGCTTGTGGAGAAGGA 3q 5qFAM CGCCTCCAGGAGCCCAGCTATGA TAMRA 3q	68 pb
<i>TNFA</i>	5qATGTCTGCCTCGCGCCTGGC 3q 5qCCAATTCTCTTTTTGAGCCAGAA 3q 5qFAM CCCCTCCTTCAGACACCCTCAACC TAMRA 3q	71 pb

4.6 Isolamento dos exossomos urinários e estudo da expressão da proteína WT-1

Os exossomos urinários foram isolados de acordo com a metodologia descrita por Psitikun et al¹⁴. Inicialmente a amostra foi centrifugada a 1000rpm

para a remoção dos restos celulares e mantida a -80°C para as análises posteriores. Após descongelas, as amostras foram agitadas vigorosamente e os exossomos foram isolados por centrifugação diferencial, primeiramente a $17.000\times g$ por 10min e posteriormente o sobrenadante foi separado e centrifugado a $200.000\times g$ por 1h. O precipitado final, contendo os exossomos, foi ressuspenso em tampão Laemmli.

As proteínas isoladas dos exossomos foram separadas por eletroforese em gel utilizando o gel NUPAGE® 4-12% Bis-Tris (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) e transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando um sistema de transferência a seco (iBlot®, Life Technologies). A análise por Western-Blot foi realizada com um anticorpo monoclonal de camundongo anti-WT-1 (Millipore, Temecula, CA, EUA) e um anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-IgG de camundongo (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, EUA). A imunotransferência para a Aquaporina-2 (AQP2) foi realizada utilizando um anticorpo de coelho anti-AQP2 (gentilmente cedida pelo Dr. Mark A. Knepper, NHLBI, NIH) e um anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-IgG de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) com a finalidade de confirmar que as amostras que não expressaram WT-1 continham proteínas dos exossomos. A reação antígeno-anticorpo foi visualizada após a exposição ao substrato quimioluminescente SuperSignal® WestPico (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) e as imagens capturadas utilizando o sistema de imagem FluorChem (Cell Biosciences, Santa Clara, CA, EUA). A análise densitométrica das bandas foi realizada utilizando o programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

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 nefropatia 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 POLYMORPHISMS IN *IL6* GENE PROMOTER REGION WITH TYPE 1 DIABETES AND INCREASED ALBUMIN-TO-CREATININE RATIO" foi submetido para publicação no periódico *Clinica Chimica Acta* que possui fator de impacto 2,850 e Qualis A2 da CAPES para área de Medicina II

Elsevier Editorial System(tm) for Clinica Chimica Acta
Manuscript Draft

Manuscript Number: CCA-D-14-00551

Title: ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN IL6 GENE PROMOTER REGION WITH TYPE 1 DIABETES AND INCREASED ALBUMIN-TO-CREATININE RATIO

Article Type: Research Paper

Keywords: type 1 diabetes; diabetic nephropathy; IL-6; polymorphism

Corresponding Author: Prof. Adriana Rezende,

Corresponding Author's Institution: Federal University of Rio Grande do Norte

First Author: Marcela A Ururahy

Order of Authors: Marcela A Ururahy; Karla S Souza; Yonara M Oliveira; Melina B Loureiro; Heglayne P Silva; Francisco P Freire-Neto; Joao F Bezerra; Andre D Luchessi; Sonia Q Doi; Rosario D Hirata; Maria G Almeida; Ricardo F Arrais; Mario H Hirata; Adriana Rezende

Abstract: Background: Pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-6 (IL-6), have been pointed as key factors in type 1 diabetes mellitus (T1DM) and diabetic nephropathy development. Thus, our aim was to investigate the association of IL6 -174G>C (rs1800795) and -634C>G (rs1800796) polymorphisms with T1DM susceptibility and diabetic nephropathy development.

Methods: These polymorphisms were analyzed in 144 children and adolescents with T1DM and 173 normoglycemic (NG) control subjects. Glycemic control, laboratory parameters of kidney function and serum lipids were evaluated. Studying only T1DM patients, we evaluated the polymorphisms association with biochemical parameters in various genetic models.

Results: T1DM patients showed poor glycemic control, and albumin-to-creatinine ratio (ACR), total cholesterol and LDL-cholesterol increased levels when compared to NG subjects ($p < 0.001$, $p = 0.004$ and $p < 0.001$, respectively). IL6 -174C allele was associated with an increased risk of developing T1DM (OR=1.53, CI=1.01-2.31, $p = 0.044$). In T1DM group, IL6 -174CC carriers showed higher concentrations of glycated hemoglobin ($p = 0.029$), ACR ($p = 0.021$), total cholesterol ($p = 0.010$) and LDL-cholesterol ($p = 0.002$), when compared to GG+GC carriers. No association was found for IL6 -634C>G polymorphism.

Conclusion: These results suggest that IL6-174G>C may contribute to T1DM and increased ACR, as well as, to poor glycemic control and hyperlipidemia.

Suggested Reviewers: Sergio A Dib
sergio.dib@unifesp.br

Jason Cooper
jason.cooper@cimr.cam.ac.uk

Katarzyna Zorena
kzorena@amg.gda.pl

ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN *IL6* GENE PROMOTER REGION WITH TYPE 1 DIABETES AND INCREASED ALBUMIN-TO-CREATININE RATIO

Marcela Abbott Galvão Ururahy^a, Karla Simone Costa de Souza^a, Yonara Monique da Costa Oliveira^a, Melina Bezerra Loureiro^a, Heglayne Pereira Vital da Silva^a, Francisco Paulo Freire-Neto^a, João Felipe Bezerra^a, André Ducati Luchessi^a, Sonia Quateli Doi^b, Rosario Dominguez Crespo Hirata^c, Maria das Graças Almeida^a, Ricardo Fernando Arrais^d, 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 59012570, Brazil

^b Department of Medicine, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD 20814, USA

^c Department of Clinical and Toxicological Analyses, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508900, Brazil

^d Department of Pediatrics, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN 59012570, Brazil

*** Corresponding author:**

Adriana Augusto de Rezende

Av. General Gustavo Cordeiro de Farias, S/N, Faculdade de Farmácia, Petrópolis, CEP: 59012-570, Natal, RN, Brazil

Tel: +55 84 3342-9807

Fax: +55 84 3342-9833

e-mail: adrirezende@yahoo.com

Abstract

Background: Pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-6 (IL-6), have been pointed as key factors in type 1 diabetes mellitus (T1DM) and diabetic nephropathy development. Thus, our aim was to investigate the association of *IL6* -174G>C (rs1800795) and -634C>G (rs1800796) polymorphisms with T1DM susceptibility and diabetic nephropathy development.

Methods: These polymorphisms were analyzed in 144 children and adolescents with T1DM and 173 normoglycemic (NG) control subjects. Glycemic control, laboratory parameters of kidney function and serum lipids were evaluated. Studying only T1DM patients, we evaluated the polymorphisms association with biochemical parameters in various genetic models.

Results: T1DM patients showed poor glycemic control, and albumin-to-creatinine ratio (ACR), total cholesterol and LDL-cholesterol increased levels when compared to NG subjects ($p<0.001$, $p=0.004$ and $p<0.001$, respectively). *IL6* -174C allele was associated with an increased risk of developing T1DM (OR=1.53, CI=1.01-2.31, $p=0.044$). In T1DM group, *IL6* -174CC carriers showed higher concentrations of glycated hemoglobin ($p=0.029$), ACR ($p=0.021$), total cholesterol ($p=0.010$) and LDL-cholesterol ($p=0.002$), when compared to GG+GC carriers. No association was found for *IL6* -634C>G polymorphism.

Conclusion: These results suggest that *IL6*-174G>C may contribute to T1DM and increased ACR, as well as, to poor glycemic control and hyperlipidemia.

Keywords: type 1 diabetes, diabetic nephropathy, IL-6, polymorphism

1. Introduction

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is characterized by an autoimmune destruction of the insulin-secreting pancreatic beta-cells, elicited by lymphocytes and inflammatory cytokines [1]. Long-standing hyperglycemia [2] and the low-grade inflammation that underlies the course of T1DM [3] play critical roles in the development of complications, such as nephropathy.

Diabetic nephropathy (DN) is a major complication of T1DM. Convincing evidence indicates that both genetic and environmental factors may trigger a complex series of pathophysiological events involved in DN development [4]. Studies from the past 10 years have shown that inflammation plays a key role in the development and progression of this renal injury [4,5]. In 1991, for the first time, researchers showed that inflammatory cytokines could participate in the pathogenesis of DN [6]. Later studies have demonstrated that intrinsic renal cells (endothelial, mesangial, glomerular and tubular epithelial cells) are able to synthesize pro-inflammatory cytokines [7].

Interleukin-6 (IL-6), considered to be one the main regulators of inflammation, is increased in T1DM patients with DN, being higher in patients with overt proteinuria compared to those with microalbuminuria [8]. Moreover, a previous study from our research group has shown increased *IL6* mRNA expression in T1DM patients [9]. In experimental models of DN, renal expression of IL-6 was increased [10]. It has also been suggested that IL-6 promotes mesangial cell proliferation and increases glomerular endothelial cell permeability, as well as fibronectin expression [4,5]. *IL6* polymorphism -174G>C has been associated with T1DM [11. 13] and diabetic complications, such as

nephropathy [11]. Another *IL6* polymorphism, -634C>G, has also been associated with DN [2].

This study was conducted in order to investigate the association between childhood onset T1DM and *IL6* (-174G>C and -634C>G) polymorphisms. Furthermore, we also assessed the association of these polymorphisms with DN development.

2. Subjects and Methods

2.1. Study population

The patients diagnosed with T1DM [14], ranging from 6 to 20 years old, who attended the Pediatrics Hospital of the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil from January/2010 to June/2011, fitted the inclusion criteria and agreed to participate of the study (n=84) were recruited. Furthermore, samples from 55 T1DM patients with the same characteristics, recruited by this research group in a previous study [9], were included in T1DM group. Therefore, a total of 144 T1DM patients were studied. All of them were under insulin therapy. One hundred and seventy-three normoglycemic control subjects (NG; fasting serum glucose ≤ 99 mg/dL) were recruited in local public schools. Exclusion criteria, for both groups, were hypertension, presence of other inflammatory diseases, infections and pregnancy. The study protocol was approved by the University Hospital Onofre Lopes (UFRN) Human Research Ethics Committee (Protocol 307/09) and has been performed in accordance with the Declaration of Helsinki. All the study participants or their parents provided written informed consent prior to enrolment. After assessing medical history, fasting blood and spot urine samples were obtained from all subjects for biochemical analyses and genotyping.

2.2. Biochemical analyses

Glycemic control was assessed by glycated hemoglobin in total blood and fasting serum glucose. Serum urea, creatinine, albumin, and total protein concentration, as well as, aspartate amino transferase (AST) and alanine amino transferase (ALT) activities were measured to evaluate kidney and liver function. Serum total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol and triglycerides were also determined. Blood/serum 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). Albumin and creatinine were determined in urine samples using BioSystems Reagents and Instruments kits (Barcelona, Spain) and were, also, measured using RA 50 spectrophotometer (Bayer Diagnostics, Dublin, Ireland). Albumin-to-creatinine ratio (ACR) was calculated for the evaluation of renal function.

2.3. Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), previously isolated by discontinuous Histopaque (density: 1.077g/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gradient, using the Illustra Triple Prep kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). 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 *IL6* -174G>C (rs1800795) and -634C>G (rs1800796) polymorphisms. For *IL6* -

174G>C, primers and probes were designed using Primer Express® software (Applied Biosystems, Foster City, USA). Primers were synthesized by Integrated DNA Technologies (Coralville, USA) and probes, by Applied Biosystems. The primers and probes for this assay are as follows: forward, 5'-ACGACCTAAGCTGCACTTTTCC-3'; reverse, 5'-ATTGTGCAATGTGACGTCCTTT-3'; probe 1, 5qFAM-CTAGTTGTGTCTTGCCATG-MGB-3q and probe 2, 5qVIC-TAGTTGTGTCTTGCGATG-MGB-3q *IL6* -634C>G was detected using the Applied Biosystems TaqMan® pre-designed assay C_11326893_10. To validate the genotyping, 10% of the samples chosen randomly were re-genotyped.

2.4. 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). Logistic regression analysis was implemented to evaluate the effect of genetic and non-genetic variables associated with T1DM

and DN. This part of statistical analyses was performed by the SNPAssoc package [15] from the statistical software R version 2.15.2 (R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Tests with p-values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Clinical characterization

Table 1 shows clinical and biochemical data by the study group. T1DM and NG participants were comparable for sex and age distribution. As expected, serum glucose and glycated hemoglobin values were significantly higher ($p < 0.001$) in T1DM group compared to NG. Serum urea and ACR values were also significantly increased ($p < 0.001$) in T1DM when compared to NG. No difference was found for creatinine between the groups. Serum albumin and total protein were significantly lower in T1DM patients when compared to NG individuals ($p < 0.001$ and $p = 0.002$, respectively). Total cholesterol and LDL-cholesterol concentrations were significantly increased ($p = 0.004$ and $p < 0.001$, respectively) in T1DM when compared to NG. There was no significant difference for HDL-cholesterol, VLDL-cholesterol and triglycerides between the groups.

In an effort to understand the relationship between poor glycemic control, renal injury and hyperlipidemia in T1DM, correlation analysis was performed. ACR showed significantly positive correlations with time of diagnosis ($r = 0.248$, $p = 0.012$), glycated hemoglobin ($r = 0.207$, $p = 0.031$), total cholesterol ($r = 0.297$, $p = 0.015$), LDL-cholesterol ($r = 0.342$, $p = 0.005$) and triglycerides ($r = 0.244$, $p = 0.047$). Significantly positive correlation was also found between urea and LDL-cholesterol ($r = 0.207$, $p = 0.031$). Total cholesterol was significantly and positively correlated to glucose ($r = 0.261$, $p = 0.016$) and glycated hemoglobin ($r = 0.399$, $p < 0.001$). LDL-cholesterol showed significantly positive correlation

with glycated hemoglobin ($r=0.279$, $p=0.011$). VLDL-cholesterol and triglycerides were significantly positively correlated with time of diagnosis ($r=0.296$, $p=0.009$; $r=0.298$, $p=0.007$; respectively), glucose ($r=0.333$, $p<0.001$; $r=0.331$, $p=0.002$; respectively) and glycated hemoglobin ($r=0.43$, $p<0.001$; 0.453 , $p<0.001$; respectively).

Of the 144 T1DM patients studied, 16 (11%) presented with increased ACR values (14 with microalbuminuria . $30 > \text{ACR} > 300 \text{mg/g}$ of creatinine; and 2 with macroalbuminuria . $\text{ACR} > 300 \text{mg/g}$ of creatinine). All patients with micro and macroalbuminuria had poor glycemic control at the time that the samples were collected (Glucose: $274 \pm 94 \text{mg/dL}$ and Glycated hemoglobin: $11.5 \pm 3\%$). Eleven of the sixteen individuals with microalbuminuria had more than 5 years of diagnosis. The average age of these patients was 15.8 ± 1.8 years, and the age at diagnosis was 6.3 ± 2.9 years (9.5 ± 3.4 yr of diabetes). Regarding sex distribution, 50% of this group of T1DM patients with increased RAC was female.

3.2. IL6 polymorphisms in NG and T1DM subjects

Hardy-Weinberg equilibrium was verified for both studied polymorphisms in T1DM and NG subjects. Re-genotyped samples, confirmed previously established genotypes with no discrepancies.

Table 2 shows genotypic and allelic distributions for *IL6* polymorphisms. No association was found. However, for the allelic distribution of the *IL6* - $174\text{G}>\text{C}$, we found with a borderline significance ($p=0.052$) that the allele C was more frequent in T1DM group. This association was confirmed when evaluating

the polymorphisms according to the genetic model, once a significance was found for the *IL6* -174G>C polymorphism in the log-additive model ($p=0.044$) (Table 3).

In the multiple logistic regression analysis, for *IL6* -174G>C, significant p -values were found after adjusting the analysis by urea, creatinine and total protein, in the recessive genetic model (OR=5.02, CI=1.02-24.66, $p=0.033$).

In order to investigate the relationship of each polymorphism with diabetic nephropathy, since the number of patients with altered ACR was not great enough to establish a microalbuminuric group, we evaluated markers of glycemic control, lipid profile and renal function in the T1DM subjects according to the genotypes (Table 4). For the *IL6* -174G>C polymorphism, glycosylated hemoglobin, ACR, total cholesterol, and LDL-cholesterol values were significantly increased ($p=0.029$, $p=0.021$, $p=0.010$ and $p=0.002$, respectively) in the CC carriers when compared to GG+GC carriers.

4. Discussion

The development of diabetic complications occurs gradually and appears to be mainly related to the degree and length of exposure to hyperglycemia, assessed by the determination of glycated hemoglobin [16]. Results from the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) and Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) have shown that patients with poor glycemic control developed complications earlier than those patients who kept a tight glycemic control [17,18]. According to the values established by American Diabetes Association (ADA) [14] as goals for a good glycemic control (Serum glucose: 90-180mg/dL and Glycated hemoglobin <8%), T1DM patients in the present study showed a poor glycemic control, and were therefore subjected to a higher risk of developing diabetic complications.

Consequences of the unsatisfactory glycemic control could already be noticed in this study patients, since increased values of ACR were found, indicating an initial impairment of renal function in those patients. The association of ACR with risk factors for the developments of DN can be evidenced by the significantly positive correlations with time of diagnosis, glycated hemoglobin, total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides in T1DM patients. The significantly diminished concentrations of total protein and albumin may not be associated with the renal injury in this group of T1DM patients, since ACR values indicate an initial impairment of renal function and in an initial phase there is no loss of proteins in urine in order to influence their serum concentration.

Elevated serum lipids also represent a risk factor diabetes-related for renal impairment [16]. Both, total and LDL-cholesterol serum levels were significantly increased in T1DM compared to NG. In addition, LDL-cholesterol median value for T1DM group was greater than the value established by ADA [14] (LDL-cholesterol <100mg/dL) as a goal in order to prevent or postpone complications development. The abnormal lipid profile was associated with poor glycemic control, as shown by the significantly positive correlations with serum glucose and glycated hemoglobin.

The correlation of total, LDL- and VLDL-cholesterol, as well as triglycerides with ACR suggests a role for lipids in DN. However, the mechanisms by which lipids cause or exacerbate renal injury are not completely understood. Clinical and experimental studies have highlighted the potential role of dyslipidemia in the development of microalbuminuria and DN. A possible pathophysiological mechanism of lipid-induced renal injury may be explained by LDL, or modified (oxidized or glycosylated) LDL acting on kidney tissue, stimulating the production/release of cytokines, reactive oxygen species, and adhesion molecules that lead to mesangial cell proliferation, mesangial matrix accumulation, monocyte/macrophage recruitment and hemodynamic alterations, culminating in renal injury [19].

At the present time it is recognized that chronic low-grade inflammation and activation of the innate immune system are closely involved in the pathogenesis of T1DM and its complications [3]. Inflammatory cytokines are shown to be determinant in these pathogenic processes [20].

Our results show, with a borderline significance, a suggestive association between *IL6* -174 C allele and T1DM risk. The significant association found in

the log-additive model confirms this increased risk. To the best of our knowledge, the present study is the first to evaluate the association of this polymorphism with T1DM in a group of Brazilian patients. The association between T1DM and the C allele and CC genotype for *IL6* -174G>C was also shown in Polish [11], British [12] and Danish [13] patients. In contrast, another British study found that GG genotype was more frequent in T1DM patients compared to control subjects [21] and no association was identified in a meta-analysis including mainly Caucasian patients [22].

Considering T1DM patients only, increased levels of glycosylated hemoglobin, ACR, total cholesterol and LDL-cholesterol was found for *IL6* -174CC carriers, in the recessive model, suggesting that this polymorphism may be also associated with renal injury. The association of the -174CC genotype with ACR might be independent of the glycemic control, once we evaluated only T1DM patients with a poor glycemic control (glycosylated hemoglobin > 8%) and ACR values were still significantly increased in the CC carriers when compared to GG+GC carriers (data not shown). The relationship between the CC genotype and kidney injury was also reported by Mysliwska et al. [11], in which T1DM patients carrying GG genotype were shown to be protected from late diabetic complications, including nephropathy. Since IL-6 induces several alterations in the kidney, this polymorphism is thought to contribute to renal impairment in T1DM.

For the *IL6* -634C>G polymorphism, no difference in genotype and allele frequencies was found between the groups. We also found no difference in any of the evaluated biochemical parameters between genotype groups among T1DM patients. In contrast, in a study from Japan, a significant association of

the -634GG genotype with DN was shown, however they studied macroalbuminuric T2DM patients while in the present work T1DM microalbuminuric patients were evaluated [2].

The renal injury related to T1DM may be initiated by the recognition of endogenous molecules, such as modified LDL and advanced glycated end products, by toll-like receptors. Once activated, these receptors trigger their signaling pathways that culminate with pro-inflammatory cytokines production, including IL-6. Since, IL-6 acts through a wide variety of mechanisms causing renal injury, this may be one of the mechanisms contributing to the development and progression of diabetic nephropathy. This hypothesis is supported by previous results from our group, once we found increased *TLR2* and *IL6* mRNA expression in T1DM patients [9]. Moreover, our findings in the present study, including poor glycemic control and increased serum lipids in T1DM patients, and association of *IL6* -174G>C polymorphism with glycemic control, lipid metabolism and markers of renal injury reinforce this hypothesis.

One limitation of this study is the number of patients with altered ACR, which was not great enough to establish a microalbuminuric group. In this way, more studies including an increased number of T1DM patients with microalbuminuria are needed to confirm the effect of this polymorphism on the development and/or progression of T1DM and diabetic nephropathy.

In summary, our results suggest the existence of an association of the C allele for the *IL6* -174G>C polymorphism with T1DM susceptibility, and of the CC genotype with increased ACR values, as well as, with poor glycemic control and hyperlipidemia.

Acknowledgements

This study was supported by grants from CNPq (620099/2008-9 and 481402/2010-1) and FAPERN/CNPq (EFP 1543). J.F.B., M.H.H. and R.D.C.H. are recipients of fellowships from CNPq, Brazil and M.A.G.U., K.S.C.S., M.B.L. and A.D.L., from CAPES, Brazil. We are thankful to the technical support provided by the students from the LABMULT/LABIOMOL/UFRN. We are grateful to Prof. Joanlise Marco de Leon Andrade for the statistic and text reviewing of this manuscript. We thank all the physicians, nurses and hospital staff at HOSPED/UFRN who were involved in the study. The authors, also, thank all the participants and their parents who gave their consent and participated in the study.

References

- [1] Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 2009;5:219. 26.
- [2] Kitamura A, Hasegawa G, Obayashi H, Kamiuchi K, Ishii M, Yano M, et al. Interleukin-6 polymorphism (-634C/G) in the promotor region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabet Med* 2002;19:1000. 5.
- [3] Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Fuller JH, Stehouwer CDA, EURODIAB PCS. Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes - the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2005;48:370. 8.
- [4] Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Fuentes MM de, García-Pérez J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2011;7:327. 40.
- [5] Lim AKH, Tesch GH. Inflammation in diabetic nephropathy. *Mediators Inflamm* 2012;2012:1. 12.
- [6] Hasegawa G, Nakano K, Sawada M, Uno K, Shibayama Y, Ienaga K, et al. Possible role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the development of diabetic nephropathy. *Kidney International* 1991;40:1007. 12.
- [7] Sugimoto H, Shikata K, Wada J, Horiuchi S, Makino H. Advanced glycation end products-cytokine-nitric oxide sequence pathway in the development of diabetic nephropathy: aminoguanidine ameliorates the overexpression of tumour necrosis factor- and inducible nitric oxide synthase in diabetic rat glomeruli. *Diabetologia* 1999;42:878. 86.
- [8] Saraheimo M, Teppo A-M, Forsblom C, Fagerudd J, Groop P-H. Diabetic nephropathy is associated with low-grade inflammation in type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 2003;46:1402. 7.

- [9] Ururahy MAG, Loureiro MB, Freire-Neto FP, de Souza KSC, Zuhl I, Brandão-Neto J, et al. Increased TLR2 expression in patients with type 1 diabetes: evidenced risk of microalbuminuria. *Pediatr Diabetes* 2012;13:147. 54.
- [10] Sanchez-Niño M-D, Bozic M, Córdoba-Ianús E, Valcheva P, Gracia O, Ibarz M, et al. Beyond proteinuria : VDR activation reduces renal inflammation in experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Ren Physiol* 2012:F647. F657.
- [11] My liwska J, Zorena K, My liwiec M, Malinowska E, Raczy ska K, Balcerska A. The -174GG interleukin-6 genotype is protective from retinopathy and nephropathy in juvenile onset type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Res* 2009;66:341. 5.
- [12] Cooper JD, Smyth DJ, Bailey R, Payne F, Downes K, Godfrey LM, et al. The candidate genes TAF5L, TCF7, PDCD1, IL6 and ICAM1 cannot be excluded from having effects in type 1 diabetes. *BMC Med Genet* 2007;8:1. 14.
- [13] Kristiansen OP, Nolsøe RL, Larsen L, Gjesing AMP, Johannesen J, Larsen ZM, et al. Association of a functional 17beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females. *Hum Mol Genet* 2003;12:1101. 10.
- [14] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes Care* 2013;36:S11. S66.
- [15] González JR, Armengol L, Solé X, Guinó E, Mercader JM, Estivill X, et al. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 2007;23:644. 5.
- [16] Melendez-Ramirez LY, Richards RJ, Cefalu WT. Complications of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39:625. 40.
- [17] The Diabetes and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977. 86.

- [18] Group T writing team for thr DC and CT of DI and CR. Sustained Effect of Intensive Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus on Development and Progression of Diabetic Nephropathy. *J Am Med Assoc* 2003;290:2159-67.
- [19] Bonnet F, Cooper E. Potential influence of lipids in diabetic nephropathy: insights from experimental data and clinical studies. *Diabetes Metab* 2000;26:254-64.
- [20] Luis-Rodríguez D, Martínez-Castelao A, Górriz JL, De-Álvaro F, Navarro-González JF. Pathophysiological role and therapeutic implications of inflammation in diabetic nephropathy. *World J Diabetes* 2012;3:7-18.
- [21] Jahromi MM, Millward BA, Demaine AG. A polymorphism in the promoter region of the gene for interleukin-6 is associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus. *J Interf Cytokine Res* 2000;20:885-8.
- [22] Yin Y-W, Sun Q-Q, Zhang B-B, Hu A-M, Wang Q, Liu H-L, et al. The lack of association between interleukin-6 gene -174 G/C polymorphism and the risk of type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of 18,152 subjects. *Gene* 2013;515:461-5.

Table 1. Clinical and biochemical data for NG and T1DM subjects

Variables	NG <i>n</i> =173	T1DM <i>n</i> =144	p-value
Sex, <i>female</i> %	57	57	0.949
Age, <i>years</i>	11.5 ± 3.9	11.9 ± 4.0	0.211
Time of diagnosis, <i>years</i>	-	5.0 ± 3.6	-
Age at diagnosis, <i>years</i>	-	6.7 ± 3.5	-
Glucose, <i>mg/dL</i>	78 (74-85)	217 (132-317)	<0.001
Glycated hemoglobin, %	6.2 (5.3-6.9)	9.9 (7.9-12.4)	<0.001
Total Cholesterol, <i>mg/dL</i>	153 (131-178)	170 (141-197)	0.004
LDL-cholesterol, <i>mg/dL</i>	89 (74-113)	110 (85-134)	<0.001
HDL-cholesterol, <i>mg/dL</i>	41 (37-50)	41 (37-47)	0.425
VLDL-cholesterol, <i>mg/dL</i>	19 (69-120)	17 (12-26)	0.643
Triglycerides, <i>mg/dL</i>	92 (69-120)	84 (62-133)	0.822
ACR, <i>mg/g of creatinine</i>	6 (4.7-7.9)	7.7 (5.2-16.1)	<0.001
Urea, <i>mg/dL</i>	22.5 (19-27)	29.2 (23.7-33)	<0.001
Creatinine, <i>mg/dL</i>	0.7 (0.6-0.9)	0.7 (0.6-0.8)	0.148
Albumin, <i>g/dL</i>	4.1 (3.5-4.4)	3.8 (3.2-4.1)	<0.001
Total protein, <i>g/dL</i>	7.0 (6.5-7.8)	6.8 (6-7.4)	0.002
AST, <i>U/L</i>	27 (21-34)	28 (21-37)	0.427
ALT, <i>U/L</i>	19 (16-28)	26 (19-37)	<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; T1DM, Type 1 diabetes mellitus; ACR, albumin-to-creatinine ratio; AST, aspartate amino transferase; ALT, alanine amino transferase; LDL, Low density lipoprotein; HDL, High density lipoprotein; VLDL, Very low density lipoprotein

Table 2. Frequencies of genetic polymorphisms in NG and T1DM subjects

Polymorphism	Genotype/Allele	NG	T1DM	p-value
		n (%)	n (%)	
<i>IL6</i> -174G>C (rs1800795)	GG	103 (67.8)	70 (58.3)	0.095
	GC	45 (29.6)	41 (34.2)	
	CC	4 (2.6)	9 (7.5)	
	G	251 (82.6)	181 (75.4)	0.052
	C	53 (17.4)	59 (24.6)	
<i>IL6</i> -634C>G (rs1800796)	CC	119 (74.8)	99 (80.5)	0.238
	CG	40 (25.2)	23 (18.7)	
	GG	0 (0)	1 (0.8)	
	C	278 (87.4)	221 (89.8)	0.448
	G	40 (12.6)	25 (10.2)	

NG, normoglycemic; T1DM, Type 1 diabetes mellitus

Table 3. Genotype distribution of polymorphisms in the studied groups according to the genetic model

Polymorphism	Genetic model	NG n (%)	T1DM n (%)	OR (95% CI)	p-value
<i>IL6 -174G>C</i> (rs1800795)	<i>Log-Additive</i>	152 (55.9)	120 (44.1)	1.53 (1.01-2.31)	0.044
<i>IL6 -634C>G</i> (rs1800796)	<i>Log-Additive</i>	159 (56.4)	123 (43.6)	0.77 (0.44-1.34)	0.193

Significant p-values are shown in bold

The genetic models with the lower p-values for each studied polymorphism are presented

NG, normoglycemic; T1DM, Type 1 diabetes mellitus; OR, odds ratio; CI, confidence interval

Table 4. Biochemical parameters according to the studied polymorphisms genotypes in T1DM patients

Polymorphisms	Glucose mg/dL	Glycated Hemoglobin %	ACR mg/g of creatinine	Total cholesterol mg/dL	LDL- cholesterol mg/dL	HDL- cholesterol mg/dL	Triglycerides mg/dL	Urea mg/dL	Creatinine mg/dL
<i>IL6 -174G>C</i>									
<i>(rs1800795)</i>									
<i>Recessive</i>									
GG+GC	217 ± 11	9.5 (1.9-11.7)	7.4 (5.2-14.4)	170 (141-193)	109 ± 4.6	43 ± 1.1	81 (62-126)	29.5 (24.0-33.0)	0.7 (0.6-0.8)
CC	275 ± 30	12.6 (10.3-13.5)	21.0 (13.1-52.0)	227 (198-278)	168 ± 33.4	44 ± 2.7	175 (90-201)	29.5 (21.0-35.0)	0.7 (0.7-0.8)
p-value	0.108	0.029	0.021	0.010	0.002	0.828	0.143	0.929	0.753
<i>IL6 -634 C>G</i>									
<i>(rs1800796)</i>									
<i>Dominant</i>									
CC	223 ± 11	9.9 (7.9-12.3)	7.5 (5.3-16.0)	174 (142-202)	113 (91-133)	43 ± 1.1	87 (63-143)	29.5 (24.0-34.0)	0.7 (0.6-0.8)
CG+GG	229 ± 25	9.6 (8.4-13.2)	7.8 (5.3-17.5)	179 (142-202)	123 (80-136)	42 ± 2.4	77 (59-107)	29.5 (20.0-32.5)	0.7 (0.6-0.8)
p-value	0.807	0.703	1.000	0.963	0.823	0.620	0.435	0.397	0.851

Results are shown as mean ± standard error or median (interquartile range)

Significant p-values are shown in bold

ACR, albumin-to-creatinine ratio; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein

5.2 O artigo "INCREASED URINARY EXOSOMAL WT-1 IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH TYPE 1 DIABETES AND MICROALBUMINURIA" está passando pelos últimos ajustes de formatação para envio para submissão no periódico *Biomarkers in Medicine* que possui fator de impacto 3,217 e Qualis A2 da CAPES para área de Medicina II

INCREASED URINARY EXOSOMAL WT-1 IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH TYPE 1 DIABETES AND MICROALBUMINURIA

Authors

Marcela Abbott Galvão Ururahy^{1,2}, Magali Araújo², Karla Simone Costa de Souza¹, Yonara Monique da Costa Oliveira¹, Melina Bezerra Loureiro¹, Heglayne Pereira Vital da Silva¹, João Felipe Bezerra¹, Rosario Dominguez Crespo Hirata³, Mario Hioryuki Hirata³, Ricardo Fernando Arrais⁴, Maria das Graças Almeida^c, Adriana Augusto de Rezende¹, Sonia Q. Doi²

- (1) Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil
- (2) Department of Medicine, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD, USA
- (3) Department of Clinical and Toxicological Analyses, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
- (4) Department of Pediatrics, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

Corresponding author:

Sonia Q. Doi

4301 Jones Bridge Road, Room A-3071, Bethesda, MD 20814

Phone: +1 301 295-3610

Fax: +1 301 295-3557

E-mail: sonia.doi@usuhs.edu

ABSTRACT

Aims: To investigate urinary exosomal WT-1 potential as a sensitive and non-invasive biomarker of glomerular injury in children and adolescents with type 1 diabetes. **Materials & Methods:** A total of 21 subjects, 5-17 years old, were recruited: 13 with type 1 diabetes (T1D) and 8 non-diabetics (ND). Five of the

13 T1D subjects were microalbuminuric . MALB group (ACR \geq 30mg/g) and 8 had ACR<30mg/g . N-MALB group. **Results:** The mean value of WT-1/creatinine was significantly increased in the MALB group (0.88 ± 0.12) compared to both N-MALB (0.21 ± 0.15) and ND (0.05 ± 0.02) groups. Exosomal WT-1 signal in Western blot was strongly positive in 4 out of 5 albuminuric subjects. Conversely, only 1 out of 8 non-albuminuric subjects showed a strong WT-1 signal. **Conclusions:** Exosomal WT-1 content in urine can distinguish T1D children and adolescents with and without microalbuminuria.

Key-words: urinary exosomes, WT-1, type 1 diabetes, microalbuminuria, podocytes injury

5.3 O artigo *%TLR2, IL1B AND TNFA GENES POLYMORPHISMS IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH TYPE 1 DIABETES*+ está passando pelos últimos ajustes de formatação para envio para submissão no periódico *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* que possui fator de impacto 0,879 e Qualis B2 da CAPES para área de Medicina II

***TLR2, IL1B AND TNFA* GENES POLYMORPHISMS IN CHILDREN AND
ADOLESCENTS WITH TYPE 1 DIABETES**

Marcela A. G. Ururahy^a, Fabricio M. Santos^a, Karla S. C. Souza^a, Yonara M. C. Oliveira^a, Melina B. Loureiro^a, Heglayne P. V. Silva^a, João F. Bezerra^a, André D. Luchessi^a, Sonia Q. Doi^b, Rosario D. C. Hirata^c, Maria G. Almeida^a, Ricardo F. Arrais^d, Mario H. Hirata^c, Adriana A. Rezende^{a,*}

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

^b Department of Medicine, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD, USA

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

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

*Corresponding author:

Address: Avenida General Gustavo Cordeiro de Farias, S/N, Faculdade de Farmácia

Petrópolis, Natal, RN, Brazil CEP: 59012-570

Tel: +55 84 3342-9807

Fax: +55 84 3342-9833

e-mail: adrirezende@yahoo.com

Abbreviated title: *TLR2, IL1B AND TNFA* SNPs IN T1D

Keywords: Pro-inflammatory cytokines; Type 1 Diabetes; Diabetic nephropathy; gene polymorphism.

Word count of abstract: 179

Word count of manuscript: 2782

Article type: Original Article

Abstract

Background: Inflammation has been pointed as a key factor in type 1 diabetes (T1D) and diabetic nephropathy development. Our aim was to investigate the association of toll-like receptor-2 (*TLR2*) and pro-inflammatory cytokines genes polymorphisms with T1D susceptibility and diabetic nephropathy development.

Methods: *TLR2* (1350T>C . rs3804100), *IL1B* (3954C>T . rs1143634 and -511C>T . rs16944) and *TNFA* (-308G>A . rs1800629) polymorphisms were analyzed in 144 children and adolescents with T1D and 173 normoglycemic (NG) subjects. Glycemic control and laboratorial parameters of kidney function were evaluated.

Results: T1D patients showed a poor glycemic control and albumin-to-creatinine ratio (ACR) increased levels when compared to NG subjects ($p < 0.05$). None of the studied polymorphisms was associated with T1D susceptibility. Studying only T1D patients, we evaluated the polymorphisms association with biochemical parameters in various genetic models. No association was found.

Conclusions: Despite no association was found in the present study, *TLR2*, *IL1B* and *TNFA* remain possible candidate genes for T1D and DN. In order to elucidate the true contribution of these genes polymorphisms to T1D and DN susceptibility in a Brazilian population, more studies in larger samples are necessary.

6 COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E CONCLUSÕES

O projeto inicial foi intitulado: "Estudo da associação dos genes *HLA*, *TLR2*, *TLR4*, *MYD88* e de citocinas pró-inflamatórias com diabetes tipo 1 e a nefropatia diabética". O objetivo principal era estudar a associação da expressão e polimorfismos dos genes *HLA*, *TLR2*, *TLR4*, *MYD88* e de citocinas pró-inflamatórias com o desenvolvimento do diabetes tipo 1 e a nefropatia diabética, sendo a expressão gênica avaliada a partir do RNA extraído das células mononucleares do sangue periférico e das células esfoliadas do trato urinário.

Este projeto inicial foi desmembrado em dois trabalhos, sendo um de mestrado que contemplou o estudo da associação do gene *HLA* com susceptibilidade ao DM1 e os demais genes foram mantidos neste projeto de doutorado. O doutorado passou a ser intitulado "Estudo da associação dos genes *TLR2*, *TLR4*, *MYD88* e de citocinas pró-inflamatórias com diabetes tipo 1 e a nefropatia diabética" e o de mestrado, "Estudo dos genes do complexo do Antígenos Leucocitário Humano (*HLA*) associados à susceptibilidade do *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) e suas complicações". Além desses dois trabalhos, mais um projeto de doutorado e dois de mestrado fizeram parte de um estudo maior que foi aprovado e recebeu financiamento pelo CNPq (Edital nº 16/2008 - Casadinho), que tinha como título "Avaliação dos marcadores moleculares e imunomoduladores na fisiopatologia do diabetes e suas complicações clínicas". Este 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, possibilitando um enriquecimento ainda maior do nosso conhecimento.

Considerando-se que a metodologia proposta inicialmente para a obtenção das células esfoliadas da urina não obteve sucesso, uma vez que a quantidade de RNA obtida foi insuficiente para o estudo da expressão gênica a ser realizado em PCR em tempo real, foi necessário buscar novas alternativas. Em conversa com a Profa. Dra. Sonia de Quateli Doi, do Setor de Nefrologia do Departamento de Medicina da Uniformed Services University of

the Health Sciences - USUHS (Bethesda, MD, EUA) foi sugerido o isolamento dos exossomos urinários e pesquisa do WT-1 nessas microvesículas, visando avaliar o seu potencial como biomarcador precoce e não invasivo de nefropatia diabética, o que também era o objetivo com a análise do RNAm das células esfoliadas da urina. Sendo assim, a pesquisa do WT-1 nos exossomos urinários foi incluída no projeto e levou a um estágio de doutorado sanduíche de 1 ano na USUHS, sob a co-orientação da Profa. Dra. Sonia de Quateli Doi.

Quanto à contribuição científica do projeto Casadinho como um todo, foram publicadas 3 dissertações de mestrado, 2 artigos foram aceitos, 1 submetido, 2 estão em fase final de formatação para envio e 3 em preparação. Além disso, 12 resumos de trabalhos foram apresentados em congressos nacionais e internacionais; e 1 menção honrosa e 1 prêmio de melhor trabalho na categoria de Ciências Clínicas no 21st Annual Fellows Research Forum da National Kidney Foundation foram recebidos. 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 nefropatia 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. Além disso, em relação ao estudo do WT-1 nos exossomos urinários, também pelo que sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar e encontrar a associação da relação WT-1:creatinina em exossomos urinários em crianças e adolescentes com DM1 e microalbuminúria, sugerindo a importância de continuar os estudos no sentido de verificar e confirmar o potencial deste biomarcador a fim de utilizá-lo como marcador precoce e não invasivo de dano glomerular.

Em nível pessoal, o doutorado resultou em um aprofundamento científico e intelectual, adquirido através do aprendizado de novas técnicas, como a discriminação alélica, o isolamento de exossomos e extração de proteínas; do estudo em disciplinas, como Bioética e Redação de Trabalho Científico, entre outras que me proporcionou um amadurecimento científico e da discussão de

artigos em nosso grupo de pesquisa. Destaco ainda, a enriquecedora experiência do estágio do doutorado sanduíche na USUHS/EUA, que permitiu conhecer e vivenciar o ambiente científico em outro país, com a participação em diversos congressos e cursos, além da apresentação oral do trabalho no Fellows Forum da National Kidney Foundation.

Ao longo da realização deste projeto substituímos técnicas, selecionamos e delimitamos genes, contudo, todas as metas foram alcançadas devido ao comprometimento e dedicação dos alunos de iniciação científica, mestrandos 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 TLRs e de citocinas inflamatórias, 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 e contribuir para a validação da avaliação do WT-1 nos exossomos urinários como marcador precoce de nefropatia, além de avaliar outras proteínas nessas microvesículas.

Considerando novamente o âmbito pessoal, neste período de doutorado pude, ainda, contribuir e aprender com a co-orientação de dois Trabalhos de Conclusão do Curso de Farmácia/UFRN concluídos e 1 ainda em andamento; além da co-orientação de uma aluna de mestrado, estas estão pontuadas abaixo. Quanto à graduação, realizei Estágio à Docência Assistida nas disciplinas de Bioquímica Clínica e Uroanálises, o que me permitiu adquirir um pouco de vivência em sala de aula, no preparo das aulas e de outras atividades relacionadas ao ensino, com a segurança de ter um professor sempre presente. Esta experiência permitiu que eu adquirisse segurança para assumir como Professora Substituta, também na UFRN, atuando nas disciplinas Microbiologia Clínica e Estágio Farmacêutico II no semestre 2013.2. Quanto à 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 Hematologia da Faculdade de Excelência Educacional do Rio Grande do Norte . FATERN/Estácio de Sá e, uma vez aprovada em concurso para professor pretendo orientar trabalhos de mestrado e doutorado.

Com o objetivo de ampliar os meus conhecimentos e experiência científica e concorrer ao ingresso em uma instituição de ensino superior, estou buscando oportunidades de desenvolver estágio pós-doutoral no exterior.

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. **Top Score in the category of Clinical Science at the 21st Annual Fellows Research Forum, National Kidney Foundation, 2012.**

14. **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.**

- Dissertações defendidas

1. 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.
2. 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.
3. 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 TGF 1, IGF1, IGF1R e LRP5 da via WNT/ -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 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.

- Doutorados em andamento

1. Melina Bezerra Loureiro, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. PPGCSa/UFRN. Título: Estudo da associação dos genes RANK, RANKL e OPG com a osteopatia diabética.

- Lista de trabalhos publicados, aceitos, prontos para submissão e em preparação

- Artigos publicados

1. **URURAHY, M. A. G.**; LOUREIRO, M. B.; FREIRE NETO, F. P.; SOUZA, K. S. C.; ZUHL, I.; BRANDÃO NETO, J.; HIRATA, R. D. C.; DOI, S. Q.; ARRAIS, R. F.; HIRATA, M. H.; ALMEIDA, M. G.; REZENDE, A. A. . Increased TLR2 expression in patients with type 1 diabetes: evidenced risk of microalbuminuria. *Pediatric Diabetes*, v. 13, p. 147-154, 2012.
2. LOUREIRO, M. B.; **URURAHY, M. A. G.**; FREIRE-NETO, F. P.; OLIVEIRA, G. H. M.; DUARTE, V. M. G.; LUCHESSI, A. D.; BRANDÃO-NETO, J.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.; 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. *Dabetes Research and Clinical Practice*, 2014 (in press).

- 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 preparação

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

- Orientações

- Trabalhos de Conclusão do Curso de Farmácia/UFRN

1. Heglayne Pereira Vital da Silva. Estudo da expressão do mRNA de TLR2 E IL-1 em pacientes com diabetes tipo 1. (Co-orientadora), 2010.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Augusto de Rezende

2. Karla Simone Costa de Souza. Study of IL-6 (-174G>C) polymorphism association with type 1 diabetes mellitus by RFLP and allelic discrimination taqman real-time PCR techniques. (Co-orientadora), 2011.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Augusto de Rezende

3. Fabrício Melo dos Santos. Estudo da influência de citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento de microalbuminúria em pacientes com diabetes tipo 1. (Co-orientadora), em andamento.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Augusto de Rezende

- Dissertação de Mestrado

1. Karla Simone Costa de Souza. Estudo da associação dos genes TGF 1, IGF1, IGF1R e LRP5 da via WNT/ -Catenina com o desenvolvimento da osteopenia em pacientes com Diabetes mellitus tipo 1. (Co-orientadora), 2013.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Augusto de Rezende

7 REFERÊNCIAS

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes Care*. 2014 Jan;37(S1):S14. S80.
2. Sbd D. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009. 2009;
3. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol*. 2009 Apr;5(4):219. 26.
4. Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Fuentes MM de, García-Pérez J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. Nature Publishing Group; 2011 Jun;7(6):327. 40.
5. Gluba A, Banach M, Hannam S, Mikhailidis DP, Sakowicz A, Rysz J. The role of Toll-like receptors in renal diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2010;224. 35.
6. Ururahy MAG, Loureiro MB, Freire-Neto FP, de Souza KSC, Zuhl I, Brandão-Neto J, et al. Increased TLR2 expression in patients with type 1 diabetes: evidenced risk of microalbuminuria. *Pediatr Diabetes*. 2012 Mar;13:147. 54.
7. Devaraj S, Jialal I, Yun J-M, Bremer A. 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*. Elsevier Inc.; 2011 Feb;60(2):256. 9.
8. El-Achkar TM, Dagher PC. Renal toll-like receptors: recent advances and implications for disease. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006;2(10):568. 81.
9. Bjørnvold M, Munthe-Kaas MC, Egeland T, Joner G, Dahl-Jørgensen K, Njølstad PR, et al. A TLR2 polymorphism is associated with type 1 diabetes and allergic asthma. *Genes Immun*. 2009 Mar;10:181. 7.
10. Park Y, Park S, Yoo E, Kim D, Shin H. Association of the polymorphism for Toll-like receptor 2 with type 1 diabetes susceptibility. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec;1037:170. 4.

11. Lim AKH, Tesch GH. Inflammation in diabetic nephropathy. *Mediators Inflamm.* 2012 Jan;2012:1. 12.
12. Sassy-Prigent C, Heudes D, Mandet C, Bélair MF, Michel O, Perdereau B, et al. Early glomerular macrophage recruitment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 2000 Mar;49(3):466. 75.
13. Luotola K, Pääkkönen R, Alanne M, Lanki T, Moilanen L, Surakka I, et al. Association of variation in the interleukin-1 gene family with diabetes and glucose homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Nov;94(11):4575. 83.
14. Lee S-H, Lee TW, Ihm C-G, Kim MJ, Woo J-T, Chung J-H. Genetics of diabetic nephropathy in type 2 DM: candidate gene analysis for the pathogenic role of inflammation. *Nephrology.* 2005 Oct;10:S32. S36.
15. Thomson SC, Deng A, Bao D, Satriano J, Blantz RC, Vallon V. Ornithine decarboxylase, kidney size, and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes. *J Clin Invest.* 2001;107(2):217. 24.
16. Aso Y, Yoshida N, Okumura K, Wakabayashi S, Matsutomo R, Takebayashi K, et al. Coagulation and inflammation in overt diabetic nephropathy: association with hyperhomocysteinemia. *Clin Chim Acta.* 2004 Oct;348:139. 45.
17. Saraheimo M, Teppo A-M, Forsblom C, Fagerudd J, Groop P-H. Diabetic nephropathy is associated with low-grade inflammation in type 1 diabetic patients. *Diabetologia.* 2003 Oct;46:1402. 7.
18. Cooper JD, Smyth DJ, Bailey R, Payne F, Downes K, Godfrey LM, et al. The candidate genes TAF5L, TCF7, PDCD1, IL6 and ICAM1 cannot be excluded from having effects in type 1 diabetes. *BMC Med Genet.* 2007 Jan;8(71):1. 14.
19. Gillespie KM, Nolsøe R, Betin VM, Kristiansen OP, Bingley PJ, Mandrup-poulsen T, et al. Is puberty an accelerator of type 1 diabetes in IL6-174CC females? *Diabetes.* 2005;54:1245. 8.

20. Kristiansen OP, Nolsøe RL, Larsen L, Gjesing AMP, Johannesen J, Larsen ZM, et al. Association of a functional 17beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females. *Hum Mol Genet.* 2003 May 15;12(10):1101. 10.
21. My liwska J, Zorena K, My liwiec M, Malinowska E, Raczy ska K, Balcerska A. The -174GG interleukin-6 genotype is protective from retinopathy and nephropathy in juvenile onset type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Res.* 2009 Sep;66(3):341. 5.
22. Kitamura A, Hasegawa G, Obayashi H, Kamiuchi K, Ishii M, Yano M, et al. Interleukin-6 polymorphism (-634C/G) in the promotor region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2002 Dec;19(12):1000. 5.
23. Mensah-Brown EPK, Obineche EN, Galadari S, Chandranath E, Shahin A, Ahmed I, et al. Streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats: the role of inflammatory cytokines. *Cytokine.* 2005 Aug 7;31(3):180. 90.
24. Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Fuller JH, Stehouwer CDA, EURODIAB PCS. Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes - the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia.* 2005 Feb;48(2):370. 8.
25. Boraska V, Skrabic V, Culic VC, Becic K, Kapitanovic S, Zemunik T. Association of TNF promoter polymorphisms with type 1 diabetes in the South Croatian population. *Biol Res.* 2008;41:157. 63.
26. Boraska V, Zeggini E, Groves CJ, Rayner NW, Skrabi V, Diakite M, et al. Family-based analysis of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha tag polymorphisms with type 1 diabetes in the population of South Croatia. *Hum Immunol.* 2009 Mar;70(3):195. 9.
27. Iwamoto M, Mizuri S, Arita M, Hemmi H. Nuclear factor-kappaB activation in diabetic rat kidney: evidence for involvement of P-selectin in diabetic nephropathy. *Tohoku J Exp Med.* 2005;206(2):163. 71.
28. Tam FWK, Riser BL, Meeran K, Rambow J, Pusey CD, Frankel AH. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and connective

- tissue growth factor (CCN2) as prognostic markers for progression of diabetic nephropathy. *Cytokine*. Elsevier Ltd; 2009 Jul;47(1):37. 42.
29. Hoorn EJ, Pisitkun T, Zietse R, Gross P, Frokiaer J, Wang NS, et al. Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology (Carlton)*. 2005 Jun;10(3):283. 90.
 30. Pisitkun T, Shen R-F, Knepper M a. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 7;101(36):13368. 73.
 31. Vestra MD, Masiero A, Roiter AM, Saller A, Crepaldi G. Studies in Patients With Type 2 Diabetes. 2003;52(August 2002).
 32. Chang J-H, Paik S-Y, Mao L, Eisner W, Flannery PJ, Wang L, et al. Diabetic kidney disease in FVB/NJ Akita mice: temporal pattern of kidney injury and urinary nephrin excretion. *PLoS One*. 2012 Jan;7(4):e33942.
 33. Lemley K V. Diabetes and chronic kidney disease: lessons from the Pima Indians. *Pediatr Nephrol*. 2008 Nov;23(11):1933. 40.
 34. Zhou H, Cheruvanky A, Hu X, Matsumoto T, Hiramatsu N, Cho ME, et al. Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease. *Kidney Int*. 2008 Sep;74(5):613. 21.
 35. Su J, Li S-J, Chen Z-H, Zeng C-H, Zhou H, Li L-S, et al. Evaluation of podocyte lesion in patients with diabetic nephropathy: Wilmsq tumor-1 protein used as a podocyte marker. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Feb;87(2):167. 75.
 36. Quaggin SE. Transcriptional regulation of podocyte specification and differentiation. *Microsc Res Tech*. 2002 May 15;57(4):208. 11.
 37. Shankland SJ. The podocytes response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2006 Jun;69(12):2131. 47.

APÊNDICES

Apêndice 1 Ë Resultados complementares

Ressaltamos que os dados referentes à expressão do RNAm não foram explorados nos dois artigos apresentados anteriormente, entretanto estes dados estão sendo analisados em conjunto com os demais com o intuito de serem alvos de uma nova publicação.

Foi possível observar um aumento significativo da expressão para os genes *TLR2* e *MYD88* no grupo DM1 quando comparado com o grupo NG ($p < 0,05$) (**FIGURA 1**).

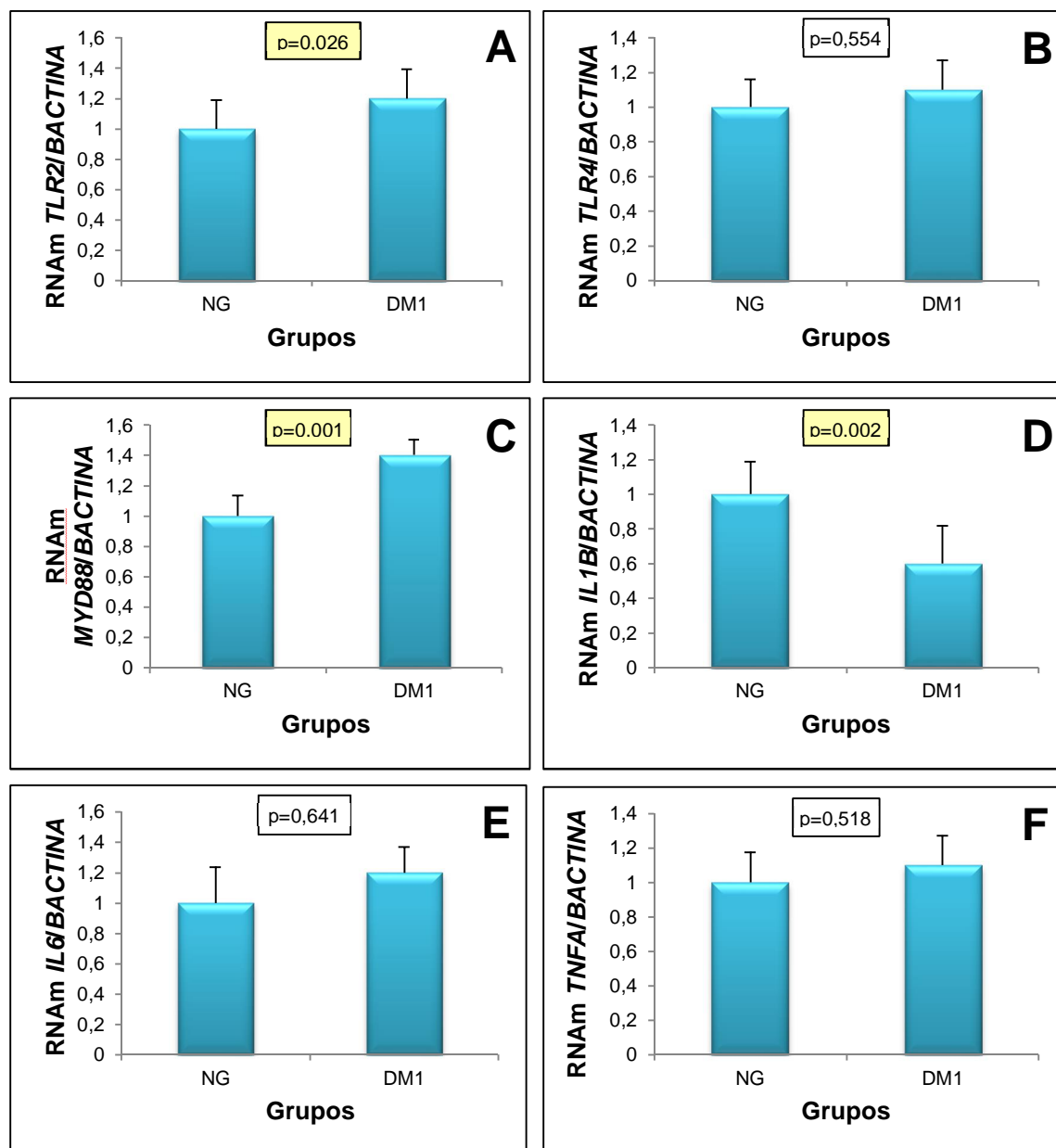


FIGURA 1 . Expressão de RNAm em PBMCs dos genes *TLR2* (A), *TLR4* (B), *MYD88* (C), *IL1B* (D), *IL6* (E) e *TNFA* (F), normalizados pela β -actina nos grupos estudados. As barras representam, o número de vezes (fold change) da expressão do RNAm nos grupos em relação à média da expressão no grupo normoglicêmico. NG: Grupo normoglicêmico; DM1: Grupo Diabetes tipo 1

Apêndice 2 É 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 *HLA*, *TLR2*, *TLR4*, *MyD88* e de citocinas pró-inflamatórias com o diabetes tipo 1 e a nefropatia 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.

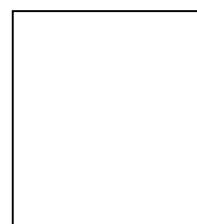
Consentimento para participação

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 É 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? _____

➤ **Dosagem de Insulina:**

➤ **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 É 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 das associações dos genes HLA, TLR2, TLR4, MyD88 e de citocinas pró-inflamatórias com o diabetes tipo 1 e a nefropatia diabética.

Protocolo – 307/09.

Pesquisador Responsável: Adriana Augusto de 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, Ad Referendum. 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 da folha de rosto.

Natal, 1 de Julho de 2009.

Dra. Maria Sanali Moura de O. Paiva
Coordenadora do CEP/HUOL

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'msanali'.

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