

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Aline Rodrigues Costa

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO *microRNA-29a-3p* NO PLASMA DE PACIENTES COM DOENÇA
RENAL DO DIABETES: UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE**

Porto Alegre

2018

Aline Rodrigues Costa

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO *microRNA-29a-3p* NO PLASMA DE PACIENTES COM DOENÇA
RENAL DO DIABETES: UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado à Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
como requisito parcial para a obtenção do título
de Farmacêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Daisy Crispim Moreira

Coorientadora: Dra. Taís Silveira Assmann

Porto Alegre

2018

AGRADECIMENTOS

“Andar com os grandes me obriga a crescer” Israel Miranda

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de estudar, pelo sonho de ter uma profissão tão especial e de ajudar as outras pessoas com meus conhecimentos adquiridos nestes seis anos de dedicação.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino de qualidade fornecido e aos meus professores que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

À minha coorientadora Dra. Taís Silveira Assmann, meu eterno agradecimento pela oportunidade de ter me aceitado como aluna de iniciação científica, pela dedicação, confiança, incentivo, paciência, amizade e por seu empenho de fazer com que esse trabalho desse certo. Obrigada pelas suas inúmeras correções e ensinamentos.

À minha orientadora Daisy Crispim Moreira, pela disponibilidade, pelos ensinamentos, atenção e dedicação disponibilizados a mim durante a iniciação científica e concretização deste trabalho.

As minhas amigas Ariane, Daniela e Renata, vocês foram fundamentais nesta caminhada. Obrigada pelos momentos de descontração, pelas palavras de força no momento de desânimo e principalmente por conquistarem este sonho junto comigo.

A todos os integrantes do Laboratório de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelos ensinamentos, em especial a Cristine Dieter pela disponibilidade e paciência.

À banca examinadora deste trabalho, Natália Emerim Lemos e Guilherme Coutinho Kullmann Duarte, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições.

E por fim, agradeço ao meu amor Luis Guilherme por tudo! Meu companheiro de todos os momentos, obrigada pela tua dedicação, amor, incentivo e por me apoiar sempre.

Agradeço também à minha família, especialmente aos meus pais, Sônia e Dilmar (*in memoriam*) e minha irmã Silvana, pelo carinho e amor incondicional, sem vocês eu não estaria realizando este sonho.

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi elaborado na forma de artigo científico de acordo com as normas da revista “Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia”, na qualidade de “Artigo Original” apresentadas em anexo.

1 **A expressão do miR-29a-3p está diminuída no plasma de pacientes com doença renal do diabetes**

2
3 Aline Rodrigues Costa^{1,2}, Cristine Dieter¹, Taís Silveira Assmann¹, Daisy Crispim ^{*1}

4
5 1 – Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul,
6 Brasil.

7 2 – Curso de Graduação em Farmácia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do
8 Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

9
10 *Correspondente: Dra. Daisy Crispim. Rua Ramiro Barcelos 2350; prédio 12; 4º andar. CEP 90035-003.

11 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: dcmoreira@hcpa.edu.br. Telefone: (51) 3359-8318

12
13 Título abreviado: O miR-29a-3p e a doença renal do diabetes

14
15 Palavras Chaves: diabetes mellitus tipo 1; doença renal do diabetes; microRNA; miR-29a-3p; TGF-β1.

16
17 Número de palavras: 2.831

18
19 Tipo de Artigo: Original

29 **RESUMO**

30

31 **Introdução:** A Doença Renal do Diabetes (DRD) é uma complicação microvascular crônica do diabetes
32 mellitus (DM) que afeta cerca de 40% dos pacientes com DM. Evidências sugerem que mecanismos
33 epigenéticos, entre eles os microRNAs (miRNAs), possuem um papel importante no desenvolvimento da
34 DRD. Nesse sentido, o miR-29a-3p participa na via de regulação do fator de transformação do crescimento
35 beta-1 (TGF- β 1) através de um sistema de retroalimentação negativa. O TGF- β 1 é um fator chave associado
36 com fibrose renal. Dessa forma, a desregulação do miR-29a-3p pode estar envolvida na patogênese da
37 DRD. Assim, o objetivo do presente estudo foi comparar a expressão do miR-29a-3p no plasma de pacientes
38 com DM tipo 1 (DM1) e DRD (casos) e em pacientes com DM1 sem DRD (controles). **Metodologia:** A
39 expressão do miR-29a-3p foi analisada no plasma de 29 pacientes com DM1: 19 casos com DRD (10
40 pacientes com DRD moderada e 9 pacientes com DRD severa) e 10 controles sem DRD, utilizando a técnica
41 de RTq-PCR (Thermo Fisher Scientific Inc). **Resultados:** A expressão do miR-29a-3p foi diminuída nos
42 pacientes com DRD severa comparado com pacientes com DRD moderada ou pacientes sem DRD. Além
43 disso, encontramos uma correlação positiva entre a expressão do miRNA e os valores de taxa de filtração
44 glomerular estimada. Não houve correlação entre a expressão do miR-29a-3p e a hemoglobina glicada.
45 **Conclusão:** A expressão do miR-29a-3p está diminuída na DRD. Entretanto, estudos em outras populações
46 e funcionais são necessários para entender o papel do miR-29a-3p na patogênese da DRD.

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57 **INTRODUÇÃO**

58

59 A doença renal do diabetes (DRD) é uma importante complicação crônica microvascular do
60 diabetes mellitus (DM) que acomete cerca de 40% dos pacientes com DM (1, 2). Além disso, é a maior
61 causa de doença renal crônica (DRC) e de doença renal crônica terminal (DRCT) em todo o mundo, sendo
62 um grande preditor de mortalidade em pacientes com DM (3). Pacientes com DRD que apresentam DRCT
63 se deparam com uma taxa de mortalidade de 20% após o primeiro ano de diálise (4).

64 Clinicamente, a DRD é caracterizada por presença de albuminúria e redução gradual na taxa de
65 filtração glomerular (TFG) (5). As alterações patológicas nas células renais de pacientes com DRD incluem
66 hipertrofia glomerular, expansão mesangial e fibrose túbulo-intersticial devido ao acúmulo de proteínas na
67 matriz extracelular, bem como afinamento da membrana basal e disfunção de podócitos (5). A nível celular
68 ocorre a ativação de células mesangiais e fibroblastos. Essa ativação ocorre como uma consequência dos
69 elevados níveis de fatores de crescimento, entre eles o fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF-
70 β 1), citocinas e espécies reativas de oxigênio no contexto de hiperglicemia, contribuindo para o dano renal
71 (4).

72 As razões do surgimento da DRD ainda não são totalmente conhecidas, entretanto, hiperglicemia,
73 hipertensão arterial, perfil lipídico, tabagismo, idade, predisposição genética e epigenética são fatores de
74 risco conhecidos para o desenvolvimento dessa complicação (6). Entre os fatores epigenéticos, os
75 microRNAs (miRNAs) têm sido associados com diversas patologias humanas, incluindo a DRD (7). Os
76 miRNAs são pequenos RNAs não codificantes de proteínas que regulam a expressão de aproximadamente
77 60% dos genes codificantes de proteínas, regulando dessa forma muitas funções celulares e influenciando
78 o desenvolvimento e progressão de diversas patologias, entre elas a DRD (8, 9).

79 Recentemente, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os miRNAs podem regular a expressão
80 do TGF- β 1, bem como TGF- β 1 também pode regular a expressão de diversos miRNAs, sugerindo que os
81 miRNAs podem ter um papel na fibrose renal (10-12). O TGF- β 1 é considerado um mediador chave na
82 patogênese da DRD, associado com fibrose renal (13).

83 Entre os miRNAs descritos como associados com a via de sinalização TGF- β 1/Smad, o miR-29a-
84 3p foi descrito como suprimido na presença de TGF- β 1 e de hiperglicemia em uma variedade de linhagens

85 celulares tanto humanas quanto murinas, incluindo células epiteliais do túbulo renal proximal, células
86 mesangiais e podócitos (14-16), o que poderia predispor a DRD. De acordo com os resultados obtidos em
87 linhagens celulares, o bloqueio do miR-29a-3p em ratos com diabetes promoveu a desacetilação das
88 histonas, diminuindo a expressão da proteína nefrina e, conseqüentemente, induziu a apoptose de podócitos,
89 proteinúria e disfunção renal (16). Além disso, o miR-29a-3p tem como alvos os genes do colágeno,
90 alterando a expressão de proteínas na matriz extracelular. Ainda, a administração de um inibidor de TFG-
91 β 1, em ratos, preveniu a fibrose renal e restabeleceu a expressão de miR-29a-3p (17). Além dos estudos *in*
92 *vitro* ou *in vivo*, alguns estudos em humanos sugerem uma relação entre a expressão do miR-29a-3p e os
93 diferentes estágios da DRD (9, 10). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar a
94 expressão do miR-29a-3p no plasma de pacientes com DM1 com e sem DRD de uma população do sul do
95 Brasil.

96

97 **MATERIAIS E MÉTODOS**

98

99 *Grupos de estudo*

100

101 O presente estudo de caso-controle foi desenhado de acordo com as diretrizes do STROBE para
102 estudos de associação (18). A amostra do estudo incluiu 29 pacientes com DM1, sendo 10 pacientes sem
103 DRD (controles) e 19 casos com diferentes graus de DRD (10 pacientes com DRD moderada e 9 pacientes
104 com DRD severa).

105 Todos os pacientes incluídos nesse estudo foram atendidos nos Ambulatórios de Endocrinologia
106 do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) ou do Instituto da Criança com Diabetes (Grupo Hospitalar
107 Conceição) e foram recrutados entre agosto de 2014 e setembro de 2016. A DRD foi definida seguindo os
108 critérios da *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) (19). Dessa forma, os pacientes
109 incluídos nesse estudo foram divididos em três grupos: 1) pacientes sem DRD e mais de 10 anos de
110 diagnóstico de DM1 [excreção urinária de albumina (EUA) < 30 mg/g e taxa de filtração glomerular
111 estimada (TFGe) \geq 60 ml/min/1,73m²; grupo controle]; 2) pacientes com DRD moderada (EUA 30 –

112 300mg/g e/ou TFG_e 30 – 59 ml/min/1,73²); e 3) pacientes com DRD severa (EUA > 300 mg/g e/ou TFG_e
113 1 – 29 ml/min/1,73m²). O grupo caso foi constituído pelos pacientes com DRD moderada ou severa.

114 Os critérios de inclusão dos pacientes foram: idade entre 18 e 40 anos e diagnóstico de DM1 de
115 acordo com os critérios da *American Diabetes Association* (ADA) (20). O grupo étnico foi definido com
116 base na autoclassificação e apenas foram incluídos os pacientes que se autodeclaram brancos, com o
117 objetivo de diminuir o viés de estratificação.

118 Todos os indivíduos incluídos no presente estudo foram submetidos a uma entrevista para coletar
119 informações sobre idade, idade no diagnóstico de DM1, duração do DM1, histórico de outras patologias e
120 medicamentos utilizados, bem como coletaram amostras de sangue e de urina para exames laboratoriais e
121 extração de RNA, como descrito em um estudo prévio do grupo (21). Além disso, as amostras de soro e de
122 plasma foram coletadas no período da manhã com pelo menos 8 horas de jejum para as análises bioquímicas
123 (21). A creatinina sérica foi medida através da reação de Jaffé e a EUA por imunoturbidimetria (Sera-Pak
124 immuno microalbuminuria, Bayer, Tarrytown, NY, USA). A TFG_e foi calculada utilizando a fórmula
125 proposta pela *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI), usando calculadoras
126 calibradas (Sociedade Brasileira de Nefrologia): $TFG_e = 141 \times \min(SCR/\kappa, 1)^\alpha \times \max(SCR/\kappa, 1)^{-1,209} \times$
127 $0,993^{idade} \times 1,018$ [se feminino] $\times 1,159$ [se negro]. Onde SCR corresponde a creatinina sérica (mg/dL), κ é
128 a constante de 0,7 para mulheres e 0,9 para homens e α é uma constante de -0,329 para mulheres e -0,411
129 para homens. Min indica o mínimo de SCR/ κ ou 1, e max indica o máximo de SCR/ κ . Todo o protocolo do
130 estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HCPA e do Grupo Hospitalar Conceição/Instituto
131 da Criança com Diabetes e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido
132 (TCLE).

133

134 *Extração de RNA*

135

136 As amostras de sangue periférico de todos os pacientes foram coletadas com pelo menos 8 horas
137 de jejum em tubos com EDTA no turno da manhã. Imediatamente após a coleta, as amostras não
138 hemolisadas foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos a 4°C e as alíquotas de plasma foram
139 armazenadas a -80°C até a extração do RNA. O RNA total foi extraído de 450 µl do plasma de todos

140 pacientes incluídos no estudo (casos e controles) usando o kit miRVana PARIS (mirVana PARIS miRNA
141 Isolation, Ambion, Thermo Fisher Scientific) seguindo-se as recomendações do fabricante. A pureza e
142 concentração das amostras de RNA foram avaliadas utilizando o equipamento NanoDrop (Thermo Fisher
143 Scientific). Somente as amostras que atingiram os níveis adequados de pureza ($A_{260}/A_{280} = 1,9 - 2,1$)
144 foram utilizadas para as análises seguintes.

145

146 *Análise da expressão do miR-29a-3p circulante no plasma de casos e controles*

147

148 A quantificação da expressão do miR-29a-3p no plasma de casos e controles foi realizada utilizando
149 a técnica de RT-qPCR (PCR em tempo real) de acordo com o recomendado pelos critérios do MIQE para
150 estudos de expressão gênica (22). Os experimentos de quantificação relativa através da técnica de RT-qPCR
151 foram realizados através de duas reações separadas: primeiro, o RNA total foi retro-transcrito em DNA
152 complementar (cDNA) e depois o cDNA foi amplificado pela técnica de RT-qPCR. A transcrição reversa
153 de 2 ng/ μ l de RNA para cDNA foi realizada utilizando o reagente TaqMan miRNA Reverse-Transcription
154 kit (Thermo Fisher Scientific), o qual nos permite a síntese de um cDNA específico para o miRNA
155 analisado, pois utiliza *primers* específicos. Assim, para esse estudo utilizamos os seguintes kits tanto para
156 a reação de cDNA quanto para a reação de PCR: hsa-miR-29a-3p (número de catálogo: 002112) e *Small*
157 *nuclear RNA U6* (U6snRNA) (número de catálogo: 001973), como gene de referência.

158 Após, a quantificação da expressão do miR-29a-3p foi realizada pela técnica de RT-qPCR no
159 aparelho ViiA7 (Thermo Fisher Scientific), utilizando ensaios de quantificação relativa em um volume final
160 de 10 μ l, contendo 5 μ l de TaqMan Universal Master Mix II 1x sem UNG (Thermo Fisher Scientific), 0,25 μ l
161 de TaqMan microRNA assay 1x (Thermo Fisher Scientific) específico para o miR-29a-3p e para o
162 U6snRNA e 10ng de cDNA específico para cada gene (alvo ou referência). As seguintes condições de
163 ciclagem foram utilizadas: 95°C por 10 min, seguidos por 50 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 90 s. A
164 quantificação do miRNA foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ e o gene de referência *U6snRNA* e é
165 apresentada como *n-fold changes* em relação a amostra calibradora.

166

167

168 *Análises estatísticas*

169

170 As variáveis contínuas foram primeiramente testadas para normalidade da distribuição através do
171 teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuições normais são mostradas como média \pm desvio
172 padrão (DP). Variáveis com distribuição não-paramétrica foram transformadas para a escala logarítmica
173 antes de realizar as análises e são mostradas como mediana (percentil 25-75). Variáveis categóricas são
174 mostradas como porcentagem (%). As características clínicas e laboratoriais, bem como a expressão do
175 miRNA foram comparadas entre os grupos utilizando os testes de ANOVA, teste t de Student ou χ^2 ,
176 conforme o apropriado. As correlações entre variáveis quantitativas foram analisadas utilizando o teste de
177 correlação de Pearson. Todas as análises foram realizadas com o software estatístico SPSS 20.0 para
178 Windows (SPSS Inc, Chicago, IL). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

179

180 **RESULTADOS**

181

182 *Descrição da amostra*

183

184 As características clínicas e laboratoriais dos controles e dos casos divididos pelos graus de DRD
185 (moderada ou severa) estão descritas na **tabela 1**. Casos e controles não diferiram significativamente em
186 relação à idade, % de homens, ao índice de massa corporal (IMC), à hemoglobina glicada (HbA1c) e ao
187 perfil lipídico. Além disso, conforme esperado, pode-se observar uma maior prevalência de hipertensão e
188 retinopatia diabética (RD) nos pacientes com DRD severa comparado com os demais grupos ($p = 0,001$).

189

190 *A expressão do miR-29a-3p está diminuída no plasma de pacientes com DRD em comparação com*
191 *os controles.*

192

193 A expressão do miR-29a-3p está diminuída no plasma de pacientes com DRD quando comparado
194 aos controles sem essa complicação [mediana (p25 – 75): 0,37 (0,05 – 1,21) vs 1,39 (0,34 – 3,20); $p =$
195 0,042]. Além disso, como mostrado na **figura 1**, parece que a expressão do miRNA analisado está associada

196 com a gravidade da DRD ($p = 0,021$). A expressão do miR-29a-3p foi diminuída no plasma de pacientes
197 com DRD severa comparada com pacientes controles [0,13 (0,01 – 0,53) vs 1,39 (0,34 – 3,20); $p = 0,018$].
198 Ademais, a expressão do miR-29a-3p parece diminuir com a gravidade da DRD [DRD moderada: 0,59
199 (0,18 – 2,23) vs DRD severa: 0,13 (0,01 – 0,53); $p = 0,090$]. No entanto, a comparação da expressão do
200 miR-29a-3p entre pacientes com DRD severa e moderada não atingiu significância estatística formal.

201

202 *Associação entre a expressão do miR-29a-3p e as características clínicas e laboratoriais*

203

204 Nós avaliamos as possíveis correlações entre as características clínicas e laboratoriais dos pacientes
205 incluídos no estudo e a expressão do miR-29a-3p (**tabela 2**). A expressão do miR-29a-3p foi positivamente
206 correlacionada com a TFGe ($r = 0,462$; $p = 0,019$). Além disso, a expressão do miR-29a-3p foi inversamente
207 correlacionada com os níveis de creatinina sérica ($r = -0,466$; $p = 0,019$). Não foram evidenciadas
208 correlações entre a expressão do miR-29a-3p e a EUA e a HbA1c ($p < 0,05$).

209

210 **DISCUSSÃO**

211

212 A hiperglicemia crônica induz o aumento da expressão de TGF- β 1, aumentando o acúmulo de
213 proteínas na membrana extracelular e fibrose renal, contribuindo para o quadro de injúria renal encontrado
214 na DRD (8, 15). Estudos têm demonstrados que o miR-29a-3p tem como genes alvos os genes colágenos e
215 que participa na via de sinalização TGF- β 1/Smad (15). Além disso, o miR-29a-3p foi descrito como
216 desregulado na urina ou plasma de pacientes com DRD (9). Assim, nós analisamos a expressão do miR-
217 29a-3p no plasma de pacientes com DM1 de acordo com a presença de DRD. Nossos resultados indicam
218 que o miR-29a-3p está diminuído em pacientes com DRD comparado a pacientes sem essa complicação e
219 que essa diminuição é proporcional a gravidade da doença, sugerindo que a presença do miR-29a-3p pode
220 ser um fator protetor contra a perda de função renal.

221 O miR-29a-3p pertence à família hsa-miR-29-3p, a qual possui três membros: hsa-miR-29a-3p,
222 hsa-miR-29b-3p e hsa-miR-29c-3p (23-25). Por mais que a estrutura dos membros da família seja
223 semelhante, eles possuem diferentes localizações dentro da célula: o miR-29a-3p está localizado

224 principalmente no citoplasma, enquanto que os miRNAs miR-29b e miR-29c são encontrados enriquecidos
225 no núcleo. Além disso, o miR-29a-3p é expresso em todos os estágios do ciclo celular, enquanto que os
226 demais são rapidamente degradados em células em divisão (26). Tais características fazem do miR-29a-3p
227 um possível candidato a biomarcador de patologias.

228 Estudos experimentais indicam que o miR-29a-3p possui atividades antifibróticas, especialmente
229 por bloquear a expressão de diferentes tipos de colágenos através da via TGF- β 1 dependente de Smad3, o
230 que leva a uma diminuição no acúmulo de proteínas na matriz extracelular e, conseqüentemente, diminuiu
231 a fibrose renal (14, 15, 23, 27), como mostrado na **figura 2**. Nesse sentido, nossos resultados demonstraram
232 que a expressão do miR-29a-3p estava diminuída em pacientes com DRD severa comparada aos demais
233 grupos.

234 A expressão do miR-29a-3p foi descrita como sendo diminuída pelo TGF- β 1 e hiperglicemia em
235 uma variedade de linhagens celulares, incluindo células epiteliais de túbulo proximal renal tanto de
236 humanos quanto de ratos, células mesangiais murinas e podócitos humanos (14-16), o que pode predispor
237 a DRD. De acordo com os resultados obtidos em linhagens celular, o bloqueio do miR-29a-3p em ratos
238 com diabetes promoveu a desacetilação das histonas, diminuindo a expressão da proteína nefrina e,
239 conseqüentemente, causando a apoptose de podócitos, proteinúria e disfunção renal (16). Ainda, ratos
240 diabéticos com superexpressão de miR-29a-3p demonstraram uma melhora na função renal e viabilidade
241 de podócitos e uma diminuição na fibrose renal comparado aos ratos controles (16). Interessantemente, um
242 estudo recente demonstrou que linagliptina, um inibidor da enzima dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4), usada
243 como droga anti-diabetogênica, também pode conferir proteção renal e diminuição da fibrose renal em um
244 modelo animal de DRD por aumentar a expressão de miR-29a-3p, o qual bloqueia a enzima DPP-4 (28).

245 Os dados do estudo de Pezzolesi e colaboradores (29) demonstraram que o miR-29a-3p estava
246 menos expresso no plasma de pacientes que progrediram rapidamente para DRCT comparado com os
247 pacientes que não progrediram, enquanto que o aumento de um desvio padrão na média da expressão do
248 miR-29a-3p foi associado com proteção para rápida progressão da DRCT em pacientes com DM1 (29). No
249 entanto, outros estudos têm descrito o miR-29a-3p como aumentado no soro, plasma, urina ou biópsia de
250 rim de pacientes com DRD (11, 30, 31). Esses resultados contraditórios podem ser explicados por

251 diferenças no tecido analisado, métodos utilizados para a classificação da DRD ou tipo de DM de base
252 (DM1, DM2) dos indivíduos incluídos nos estudos.

253 Sendo assim, o miR-29a-3p parece estar associado com as vias e mecanismos importantes
254 relacionados à patogênese da DRD, visto que se mostrou diminuído nos pacientes com DM1 e DRD
255 moderada e severa progressivamente. Outro achado interessante foi que a expressão do miR-29a-3p está
256 correlacionada com TFGe.

257 Nossos achados corroboram com os dados já existentes na literatura que demonstram que o miR-
258 29a-3p pode estar envolvido em fibrose renal, atuando através da via de sinalização TGF- β 1/Smad. Além
259 disso, também podemos hipotetizar que o miR-29a-3p possui um papel protetor na fibrose renal, pois está
260 envolvido na produção de diversos tipos de colágenos e conseqüentemente na deposição de proteínas na
261 matriz extracelular. Assim, o aumento da expressão de miR-29a-3p diminuiria a expressão de TGF- β 1 bem
262 como diminuiria também a expressão de diversos tipos de colágenos e finalmente contribuindo para a
263 diminuição da fibrose renal. Tentando extrapolar os dados encontrados para a prática clínica, podemos
264 sugerir que o miR-29a-3p poderia ser um biomarcador de declínio da função renal, podendo identificar
265 pacientes com mais risco de progressão para a DRCT.

266 Em conclusão, o presente estudo indica que o miR-29a-3p está diminuído na presença de DRD, e
267 que essa diminuição é proporcional a progressão com da DRD. Dessa forma, podemos sugerir que o miR-
268 29a-3p pode ser um marcador de doença renal. No entanto, é necessário validar o experimento em outras
269 populações para entender o envolvimento do miR-29a-3p na patogênese da DRD e para confirmar sua
270 utilidade como biomarcador que poderia detectar clinicamente os estágios iniciais da DRD e o declínio
271 progressivo da função renal.

272

273 **AGRADECIMENTOS**

274

275 Este estudo foi parcialmente apoiado por verbas do Conselho Nacional de Desenvolvimento
276 Científico e Tecnológico (CNPq; número de concessão: 482525/2013-4), Fundo de Incentivo à Pesquisa e
277 Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (número 14-0213), Fundação de Amparo à
278 Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal

279 de Nível Superior (CAPES). Daisy Crispim possui bolsa de produtividade do CNPq, Aline Rodrigues Costa
280 recebeu bolsa de iniciação científica FAPERGS, Taís Silveira Assmann e Cristine Dieter recebem bolsa de
281 pós-graduação da CAPES.

282

283 **CONFLITOS DE INTERESSE**

284

285 Os autores declaram não haver conflito de interesse.

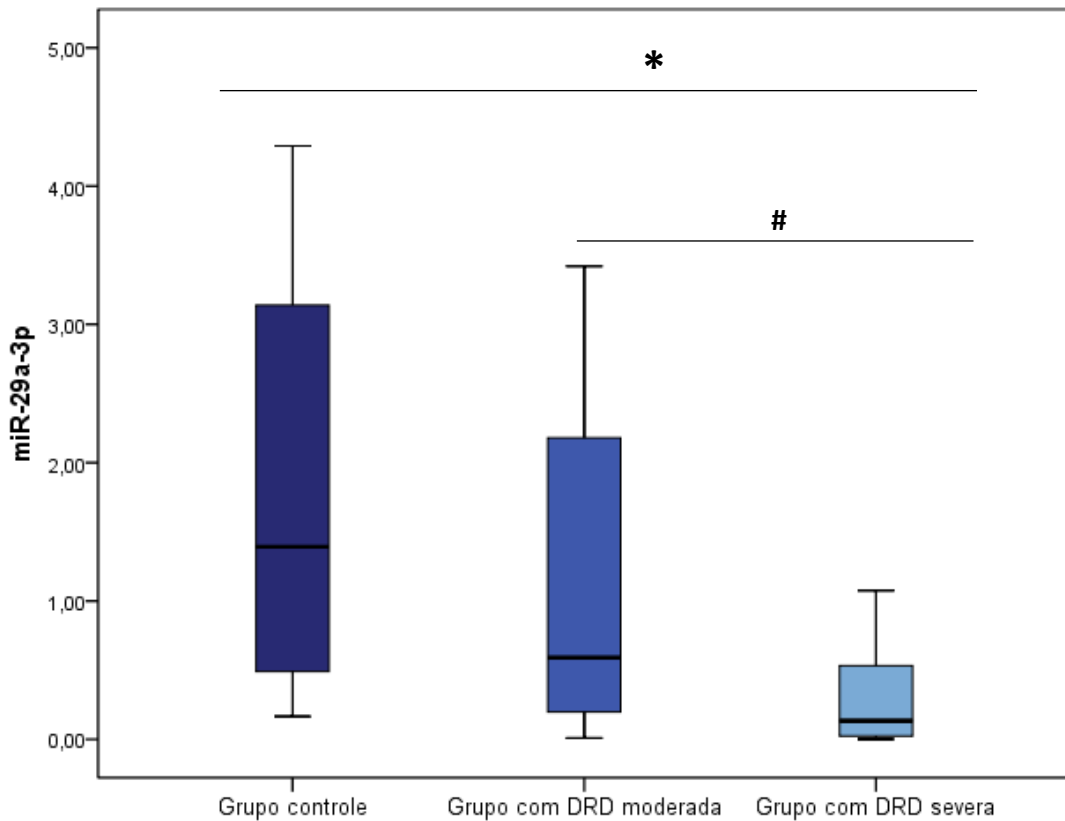
Tabela 1 – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com DM1 há mais de 10 anos e sem DRD (controles) e dos pacientes com DRD moderada ou severa (casos).

Características	DM1 controle (n = 10)	DRD moderada (n = 10)	DRD severa (n = 9)	Valor p*
Idade (anos)	25,2 ± 5,5	22,3 ± 5,0	26,8 ± 5,3	0,374
Tempo de DM1 (anos)	14,6 ± 4,8 ^a	14,7 ± 6,6 ^a	23,1 ± 4,9 ^b	0,001
Sexo (% homens)	53,6	55,8	52,7	0,452
IMC (kg/m ²)	23,4 ± 2,9	23,6 ± 3,6	22,8 ± 3,7	0,774
HbA1c (%)	8,3 ± 1,5	10,1 ± 2,5	9,3 ± 2,1	0,153
Hipertensão (%)	10,1 ^a	12,8 ^a	73,4 ^b	0,001
Triglicerídeos (mg/dL)	82,0 (37,0 – 164,0)	113,8 (76,0 – 151,0)	125,1 (59,3 – 190,5)	0,539
Colesterol total (mg/dL)	177,43 ± 33,0	193,6 ± 79,0	186,4 ± 42,9	0,727
HDL (mg/dL)	49,1 ± 11,3	58,5 ± 14,9	62,8 ± 27,5	0,173
Creatinina sérica (µg/dL)	0,76 (0,55 – 0,98)	0,95 (66 – 1,67)	5,4 (0,79 – 11,47)	-
EUA (mg/g)	9,2 (3,4 – 10,9)	216,8 (15,4 – 447,2)	1613,1 (527,3 – 2858,4)	-
TFGe (mL/min/1,73m ³)	119,0 (109,0 – 128,0)	115,0 (89,0 – 119,0)	14,0 (6,0 – 50,5)	-
Retinopatia diabética (%)	12,5 ^a	18,8 ^a	68,8 ^b	0,001

286 Os dados são mostrados como média ± DP, mediana (percentil 25 – 75) ou porcentagem (%), de acordo
287 com o apropriado. O valor de p* foi calculado pelo teste χ^2 ou ANOVA, seguidos por teste de post hoc para
288 comparações múltiplas (análise de resíduos ou teste de Tukey, respectivamente). Análises com diferenças
289 significativas entre os grupos são indicadas por diferentes letras (p < 0,05). EUA: excreção urinária de
290 albumina; HbA1c: hemoglobina glicada; IMC: índice de massa corporal; HDL: lipoproteína de alta
291 densidade; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada

292

293



294
 295 **Figura 1. Expressão do miR-29a-3p no plasma de controles sem DRD e de casos com diferentes graus**
 296 **de DRD (DRD moderada ou DRD severa).** Os resultados são expressos em *n-fold changes* em relação à
 297 amostra calibradora (RT-qPCR - método $\Delta\Delta C_q$), usando o *U6 snRNA* como gene de referência, e são
 298 mostrados como mediana (intervalo interquartil 25% – 75%). Os valores de p foram obtidos utilizando o
 299 teste de ANOVA com teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,050$ e # $p < 0,100$. Valor de p do teste de ANOVA
 300 ($p = 0,021$).

301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309

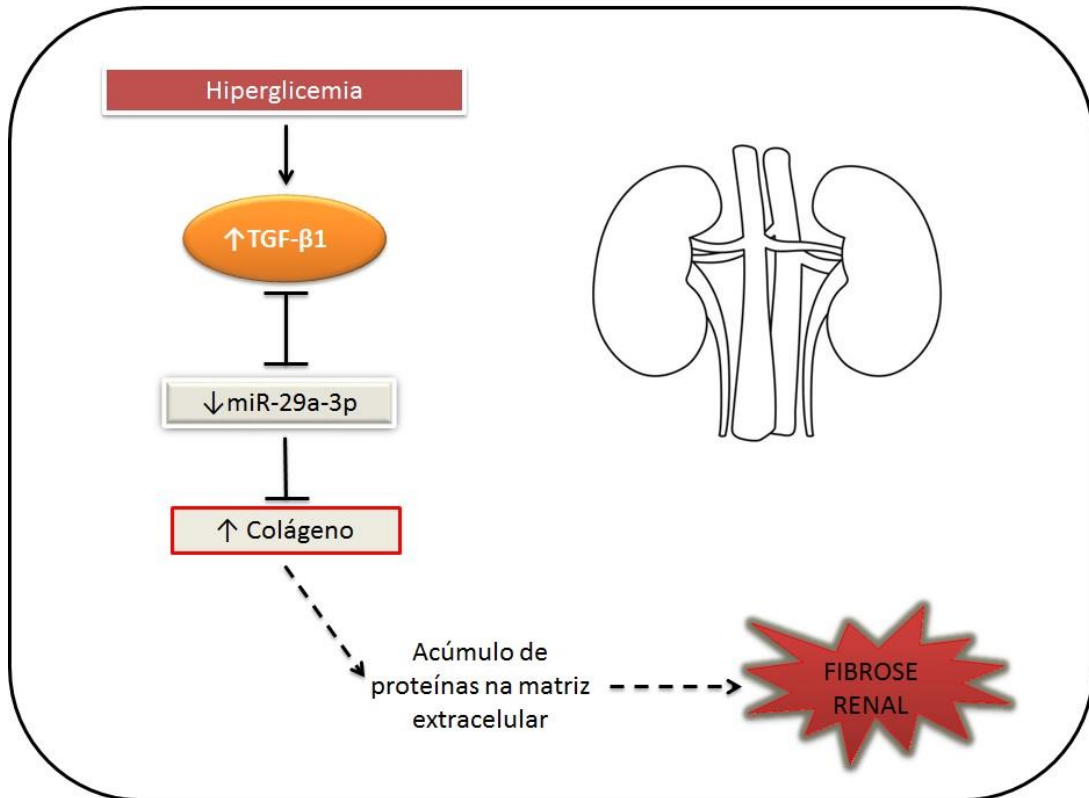
310 **Tabela 2** – Correlação entre as características laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo e o miR-29a-
311 3p.

miR-29a-3p	TFGe	Creatinina	EUA	HbA1c
Correlação				
Pearson	0,462	-0,466	-0,126	-0,198
p*	0,019	0,019	0,556	0,285

312 * Valor de p obtido através do teste de correlação de Pearson.

313 EUA: excreção urinária de albumina; HbA1c: hemoglobina glicada; TFGe: taxa de filtração glomerular
314 estimada.

315



316

317 **Figura 2. Regulação do miR-29a-3p em resposta ao TGF-β1.** Em um ambiente normoglicêmico, TGF-
 318 β1 e miR-29a-3p têm seus níveis regulados por um sistema de feedback negativo, mantendo a homeostase
 319 do sistema. No entanto, em um ambiente de hiperglicemia, os níveis de TGF-β1 estão muito aumentados,
 320 induzindo uma diminuição nos níveis de miR-29a-3p. Por consequência, há o aumento da expressão de
 321 proteínas de colágeno e um acúmulo de proteínas na matriz extracelular, o que contribui para a fibrose do
 322 tecido renal (15). TGF-β1: Fator de transformação do crescimento beta-1.

323

324 **REFERÊNCIAS**

325

326 1. Pambianco G, Costacou T, Ellis D, Becker DJ, Klein R, Orchard TJ. The 30-year natural history of
327 type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience.
328 *Diabetes*. 2006;55(5):1463-9.

329 2. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF
330 *Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045*. *Diabetes Res*
331 *Clin Pract*. 2018;138:271-81.

332 3. Carpena MP, Rados DV, Sortica DA, Souza BM, Reis AF, Canani LH, et al. Genetics of diabetic
333 nephropathy. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2010;54(3):253-61.

334 4. Reidy K, Kang HM, Hostetter T, Susztak K. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease.
335 *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(6):2333-40.

336 5. Ritz E, Zeng XX, Rychlík I. Clinical manifestation and natural history of diabetic nephropathy.
337 *Contrib Nephrol*. 2011;170:19-27.

338 6. McBrien KA, Manns BJ, Chui B, Klarenbach SW, Rabi D, Ravani P, et al. Health care costs in
339 people with diabetes and their association with glycemic control and kidney function. *Diabetes Care*.
340 2013;36(5):1172-80.

341 7. Assmann TS, Recamonde-Mendoza M, De Souza BM, Crispim D. MicroRNA expression profiles
342 and type 1 diabetes mellitus: systematic review and bioinformatic analysis. *Endocr Connect*. 2017;6(8):773-
343 90.

344 8. Kato M, Natarajan R. MicroRNAs in diabetic nephropathy: functions, biomarkers, and therapeutic
345 targets. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1353:72-88.

346 9. Assmann TS, Recamonde-Mendoza M, de Souza BM, Bauer AC, Crispim D. MicroRNAs and
347 diabetic kidney disease: Systematic review and bioinformatic analysis. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;477:90-
348 102.

349 10. Du B, Ma LM, Huang MB, Zhou H, Huang HL, Shao P, et al. High glucose down-regulates miR-
350 29a to increase collagen IV production in HK-2 cells. *FEBS letters*. 2010;584(4):811-6.

- 351 11. Peng H, Zhong M, Zhao W, Wang C, Zhang J, Liu X, et al. Urinary miR-29 correlates with
352 albuminuria and carotid intima-media thickness in type 2 diabetes patients. *PloS one*. 2013;8(12):e82607.
- 353 12. Krupa A, Jenkins R, Luo DD, Lewis A, Phillips A, Fraser D. Loss of MicroRNA-192 promotes
354 fibrogenesis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(3):438-47.
- 355 13. Sharma K, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming
356 growth factor-beta as a key mediator. *Diabetes*. 1995;44(10):1139-46.
- 357 14. Qin W, Chung AC, Huang XR, Meng XM, Hui DS, Yu CM, et al. TGF-beta/Smad3 signaling
358 promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*.
359 2011;22(8):1462-74.
- 360 15. Wang B, Komers R, Carew R, Winbanks CE, Xu B, Herman-Edelstein M, et al. Suppression of
361 microRNA-29 expression by TGF-beta1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *Journal of the*
362 *American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(2):252-65.
- 363 16. Lin CL, Lee PH, Hsu YC, Lei CC, Ko JY, Chuang PC, et al. MicroRNA-29a promotion of nephrin
364 acetylation ameliorates hyperglycemia-induced podocyte dysfunction. *Journal of the American Society of*
365 *Nephrology : JASN*. 2014;25(8):1698-709.
- 366 17. Wang B, Komers R, Carew R, Winbanks CE, Xu B, Herman-Edelstein M, et al. Suppression of
367 microRNA-29 expression by TGF-β1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*.
368 2012;23(2):252-65.
- 369 18. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP, et al. [The
370 Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines
371 for reporting observational studies]. *Rev Esp Salud Publica*. 2008;82(3):251-9.
- 372 19. Andrassy KM. Comments on 'KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and
373 Management of Chronic Kidney Disease'. *Kidney international*. 2013;84(3):622-3.
- 374 20. Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes:. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl
375 1):S13-S27.
- 376 21. Assmann TS, Brondani LeA, Bauer AC, Canani LH, Crispim D. Polymorphisms in the TLR3 gene
377 are associated with risk for type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. 2014;170(4):519-27.

- 378 22. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines:
379 minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.*
380 2009;55(4):611-22.
- 381 23. He Y, Huang C, Lin X, Li J. MicroRNA-29 family, a crucial therapeutic target for fibrosis diseases.
382 *Biochimie.* 2013;95(7):1355-9.
- 383 24. Chung AC, Yu X, Lan HY. MicroRNA and nephropathy: emerging concepts. *Int J Nephrol*
384 *Renovasc Dis.* 2013;6:169-79.
- 385 25. Assmann TS, Recamonde-Mendoza M, Costa AR, Puñales M, Tschiedel B, Canani LH, et al.
386 Circulating miRNAs in diabetic kidney disease: case-control study and in silico analyses. *Acta Diabetol.*
387 2018.
- 388 26. Amodio N, Rossi M, Raimondi L, Pitari MR, Botta C, Tagliaferri P, et al. miR-29s: a family of epi-
389 miRNAs with therapeutic implications in hematologic malignancies. *Oncotarget.* 2015;6(15):12837-61.
- 390 27. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and
391 relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiological genomics.* 2012;44(4):237-44.
- 392 28. Kanasaki K, Shi S, Kanasaki M, He J, Nagai T, Nakamura Y, et al. Linagliptin-mediated DPP-4
393 inhibition ameliorates kidney fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by inhibiting endothelial-to-
394 mesenchymal transition in a therapeutic regimen. *Diabetes.* 2014;63(6):2120-31.
- 395 29. Pezzolesi MG, Satake E, McDonnell KP, Major M, Smiles AM, Krolewski AS. Circulating TGF-
396 beta1-Regulated miRNAs and the Risk of Rapid Progression to ESRD in Type 1 Diabetes. *Diabetes.*
397 2015;64(9):3285-93.
- 398 30. Baker MA, Davis SJ, Liu P, Pan X, Williams AM, Iczkowski KA, et al. Tissue-Specific MicroRNA
399 Expression Patterns in Four Types of Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology :*
400 *JASN.* 2017.
- 401 31. Chien HY, Chen CY, Chiu YH, Lin YC, Li WC. Differential microRNA Profiles Predict Diabetic
402 Nephropathy Progression in Taiwan. *International journal of medical sciences.* 2016;13(6):457-65.

ANEXO - Normas da revista a qual será submetido o presente artigo original

Revista: Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo (ABEM)

A revista ABEM permite a submissão de artigos em língua portuguesa.

Original Articles

Original Article is a scientific report of the results of original research that has not been published or submitted for publication elsewhere (either in print or electronically). Represent a substantial body of laboratory or clinical work. In general, original paper should not exceed 3600 words in the main text, include no more than six figures and tables and 35 references.

The Journal requires that all manuscripts be submitted in a single-column format that follows these guidelines:

- The manuscript must be submitted in MS-Word format.
- All text should be double-spaced with 2cm margins on both sides using 11-point type in Times Roman or Arial font.
- All lines should be numbered throughout the entire manuscript and the entire document should be paginated.
- All tables and figures must be placed after the text and must be labeled. Submitted papers must be complete, including the title page, abstract, figures, and tables. Papers submitted without all of these components will be placed on hold until the manuscript is complete.

All submissions must include:

- A cover letter requesting that the manuscript be evaluated for publication in ABE&M and any information relevant to your manuscript. Elsewhere on the submission form authors may suggest up to three specific reviewers and/or request the exclusion of up to three others.

The manuscript must be presented in the following order:

1. Title page.
2. Structured Abstract (or summary for case reports).
3. Main text.
4. Tables and Figures. They must be cited in the main text in numerical order.
5. Acknowledgments
6. Funding statement, competing interests and any grants or fellowships supporting the writing of the paper
7. Reference list.

Title Page

The title page must contain the following information:

1. Title of the article (a concise statement of the article's major contents).
2. Full names, departments, institutions, city and country of all co-authors.
3. Full name, postal address, e-mail, telephone and fax numbers of the corresponding author.
4. Abbreviated title of not more than 40 characters for page headings
5. Up to five keywords
6. Word count - excluding title page, abstract, references, figures and tables.
7. Article type

Structured Abstracts

All Original Articles, Brief Reports, Reviews, Case Reports should be submitted with structured abstracts of no more than 250 words. The abstract must be self-contained and clear without reference to the text and should be written for a general journal readership. The abstract format should include four sections that reflect the section headings in the main text. All information reported in the abstract must appear in the manuscript. Please use complete sentences for all sections of the abstract.

Introduction

The article should begin with a brief introductory statement that places the work to follow in historical perspective and explains its intent and significance.

Materials and Methods

These should be described and referenced in sufficient detail for other investigators to repeat the work. The source of hormones, unusual chemicals and reagents, and special pieces of apparatus should be stated. For modified methods, only the modifications need be described.

Results and Discussion

The Results section should briefly present the experimental data in text, tables, and/or figures. For details on preparation of tables and figures, see below. The Discussion should focus on the interpretation and significance of the findings with concise objective comments that describe their relation to other work in that area. The Discussion should not reiterate the Results.

Authorship

The ABE&M ascribes to the authorship and contributorship guidelines defined by the International Committee of Medical Journal Editors (www.ICMJE.org). Unrestricted joint authorship is allowed. A maximum of two corresponding authors is allowed.

The uniform requirements for manuscripts submitted to medical journals state that authorship credit should be based only on substantial contribution to:

1. conception and design, or analysis and interpretation of data
2. drafting the article or revising it critically for important intellectual content
3. and final approval of the version to be published.

All these conditions must all be met. The corresponding author is responsible for ensuring that all appropriate contributors are listed as authors and that all authors have agreed to the manuscript's content and its submission to ABE&M.

Conflict of interest

A conflict-of-interest statement for all authors must be included in the main document, following the text, in the Acknowledgments section. If authors have no relevant conflict of interest to disclose, it should be indicated in the Acknowledgments section.

Acknowledgments

The acknowledgments section should include the names of those people who contributed to a study but did not meet the requirements for authorship. The corresponding author is responsible for informing each person listed in the acknowledgment section that they have been included and providing them with a description of their contribution so they know the activity for which they are considered responsible. Each person listed in the acknowledgments must give permission - in writing, if possible - for the use of his or her name. It is the responsibility of the corresponding author to collect this information.

References

References to the literature should be cited in numerical order (in parentheses) in the text and listed in the same numerical order at the end of the manuscript on a separate page or pages. The author is responsible for the accuracy of references. The number of references cited should be limited, as indicated above for each category of submission.

Tables

Tables should be submitted in the same format as your article (Word) and not another format. Please note:

we cannot accept tables as Excel files within the manuscript. Tables should be self-explanatory and the data they contain must not be duplicated in the text or figures. Tables must be constructed as simply as possible and be intelligible without reference to the text. Each table must have a concise heading. A description of experimental conditions may appear together with footnotes at the foot of the table. Tables must not simply duplicate the text or figures.

Figures and Legends

All figures must display the figure number. Sizing the figure: The author is responsible for providing digital art that has been properly sized, cropped, and has adequate space between images. All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to the authors. Authors are requested to pay the cost of reproducing color figures in print (upon acceptance of the manuscript, the publisher will provide price quotes).