

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Eloísa Toscan Massignam

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES
CODIFICADORES DO *MICRORNA-126* E DO *MICRORNA-146a* E A RETINOPATIA
DIABÉTICA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1**

Porto Alegre

2018

Eloísa Toscan Massignam

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES
CODIFICADORES DO *MICRORNA-126* E DO *MICRORNA-146a* E A RETINOPATIA
DIABÉTICA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Daisy Crispim Moreira

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Massignam, Eloísa Toscan

Estudo da associação entre polimorfismos nos genes codificadores do microRNA-126 e do microRNA-146a e a retinopatia diabética em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 / Eloísa Toscan Massignam. -- 2018.

67 f.

Orientadora: Daisy Crispim Moreira.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Diabetes mellitus. 2. Retinopatia diabética.
3. Polimorfismo. 4. MicroRNA. I. Moreira, Daisy Crispim, orient. II. Título.

Eloísa Toscan Massignam

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES
CODIFICADORES DO *MICRORNA-126* E DO *MICRORNA-146a* E A RETINOPATIA
DIABÉTICA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: 05 de julho de 2018.

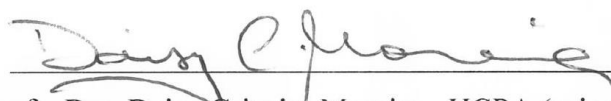
BANCA EXAMINADORA



Dra. Taís Silveira Assmann - HCPA



Profa. Dra. Letícia de Almeida Brondani - UFRGS



Profª. Dra. Daisy Crispim Moreira - HCPA (orientadora)

Aos meus pais, Agenor e Dolores.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família, especialmente aos meus pais, Agenor e Dolores Toscan Massignam, por sempre me darem todo apoio, tanto material, mas principalmente emocional, nesses anos de graduação longe de casa. Por todo incentivo e motivação, por me acalmarem e apoiarem nos momentos mais difíceis, por serem meus exemplos e meu porto seguro pra sempre. Sem vocês eu não estaria aqui.

À minha irmã, por sempre me ajudar quando precisei e descontraír esses anos de faculdade.

Ao meu namorado, Matheus Pereira Novello, por estar sempre comigo, me dando todo apoio, me confortando, por todo teu amor, paciência, compreensão, incentivo e carinho. Também, por relaxar meus anos de estudo, me fazer rir, e ser sempre meu parceiro. Amo você.

À minha orientadora, Dra. Daisy Crispim, por me dar essa oportunidade, de muito aprendizado, por toda dedicação, por todos os ensinamentos, pela disponibilidade, atenção, incentivo e paciência. Obrigada por acreditar em mim.

A todos colegas de laboratório, pelos ensinamentos e pelo apoio durante a iniciação científica e na realização desse trabalho, especialmente à Cristine Dieter, ao Guilherme Coutinho Kullmann Duarte, à Natália Emerim Lemos e ao Felipe Pellenz.

Aos meus colegas de faculdade, pelas risadas, brincadeiras, discussões, aprendizado, sentimentos compartilhados, pelo companheirismo, por todos os momentos juntos.

Aos meus amigos e amigas, por entenderem quando a resposta para o fim de semana era “tenho que estudar”, pelas festas e alegrias compartilhadas e por todo incentivo.

A CAPES, CNPq, FAPERGS e FIPE-HCPA pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram nesta caminhada.

RESUMO

Introdução: A retinopatia diabética (RD) é a principal causa de novos casos de cegueira em adultos e uma das principais complicações crônicas do diabetes mellitus (DM). Estudos sugerem que o fator genético tenha uma grande contribuição no desenvolvimento dessa patologia; entretanto, a maioria dos estudos de associação entre polimorfismos genéticos e RD tem demonstrado resultados conflitantes. Assim, a identificação de novos polimorfismos genéticos associados à RD é fundamental para uma melhor compreensão da patogênese dessa complicação crônica do DM. Neste contexto, atualmente vem se estudando polimorfismos em genes codificadores de microRNAs (miRSNPs), os quais podem alterar a biogênese desses microRNAs (miRNAs) ou suas ligações aos seus RNAs mensageiros alvos, consequentemente, modificando a expressão dos genes alvos e interferindo na susceptibilidade para desenvolver determinada patologia. Até o momento, apenas dois estudos avaliaram a associação entre os miRSNPs rs2910164 no *miR-146a* e rs4636297 no *miR-126* e a RD. **Objetivo:** Avaliar a associação do miRSNP rs4636297 (G/A) no gene *miRNA-126* e do miRSNP rs2910164 (G/C) no gene *miRNA-146a* com a RD em pacientes com DM tipo 1 (DM1). **Metodologia:** Foram analisados 196 casos com DM1 e RD (proliferativa ou não-proliferativa moderada ou grave) e 219 controles com DM1, mas sem RD ou com RD não-proliferativa leve. Os controles tinham que ter mais de 10 anos de DM1. Os polimorfismos de interesse foram genotipados através de ensaios de discriminação alélica por PCR em tempo real. Os padrões de herança dominante, recessivo e aditivo foram testados. **Resultados:** As frequências genótípicas dos polimorfismos rs4636297 (G/A) no gene *miR-126* e rs2910164 (G/C) no gene *miR-146a* estavam em equilíbrio de Hardy–Weinberg no grupo controle. Em relação ao polimorfismo rs4636297, encontrou-se uma associação do alelo A com proteção para RD nos três modelos de herança genética: recessivo, aditivo e dominante ($p = 0,023$; $p = 0,001$ e $p = 0,003$; respectivamente). De modo contrário, as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs2910164 não diferiram entre casos e controles ($p = 0,412$ e $p = 0,977$; respectivamente). Também não se observou associação desse miRSNP com RD quando analisado os diferentes modelos de herança. **Conclusão:** O presente estudo demonstrou, pela primeira vez em uma população brasileira, a associação entre o genótipo A/A do polimorfismo rs4636297 no gene *miR-126* e proteção para RD. Não foi encontrada associação entre o polimorfismo rs2910164 no gene *miR-146a* e a RD nesta mesma população.

Palavras-chave: Diabetes mellitus. Retinopatia diabética. Polimorfismo. MicroRNA.

ABSTRACT

Introduction: Diabetic retinopathy (DR) is the leading cause of new cases of blindness in adults and one of the main chronic complications of diabetes mellitus (DM). Studies have suggested that the genetic factor has a great contribution in the development of this pathology; however, most of the association studies between genetic polymorphisms and DR have shown conflicting results. Thus, the identification of new genetic polymorphisms associated with DR is fundamental for a better understanding of the pathogenesis of this chronic complication of DM. In this context, polymorphisms in genes encoding microRNAs (miRSNPs) have been studied since they may alter the biogenesis of the microRNAs (miRNAs) or their binding to the target messenger RNAs; thus, modifying the expression of the target genes and interfering in the susceptibility to develop a specific pathology. To date, only two studies have evaluated the association between rs2910164 on *miR-146a* and rs4636297 on *miR-126* and DR.

Objective: To evaluate the association of rs4636297 (G/A) polymorphism in the *miRNA-126* gene and the rs2910164 (G/C) polymorphism in the *miRNA-146a* gene with DR in patients with type 1 DM (T1DM).

Methods: We analyzed 196 cases with T1DM and DR (proliferative DR or moderate or severe non-proliferative DR) and 219 controls with T1DM but without DR or with mild non-proliferative DR. Control subjects had more than 10 years of T1DM. Polymorphisms of interest were genotyped using allele discrimination assays by real-time PCR. Dominant, recessive, and additive inheritance models were tested.

Results: Genotype frequencies of the rs4636297 (G/A) polymorphism in the *miR-126* gene and rs2910164 (G/C) in the *miR-146a* gene were in Hardy-Weinberg equilibrium in the control group. In relation to the rs4636297 polymorphism, the A allele was associated with DR protection in all genetic inheritance models tested: recessive, additive and dominant ($P = 0.023$, $P = 0.001$ and $P = 0.003$, respectively). In contrast, genotype and allele frequencies of the rs2910164 polymorphism did not differ between cases and controls ($P = 0.412$ and $P = 0.977$, respectively). Moreover, no association was found for this miRSNP when different inheritance models were analyzed.

Conclusion: The present study demonstrated, for the first time in a Brazilian population, the association between the A/A genotype of rs4636297 polymorphism in the *miR-126* gene and protection for DR. Conversely, no association was found between the rs2910164 polymorphism in the *miR-146a* gene and RD in this same population.

Keywords: Diabetes mellitus. Diabetic retinopathy. Polymorphism. MicroRNA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i> (Sociedade Americana de Diabetes)
CARD10	Proteína 10 do domínio de recrutamento de caspase
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CKD-EPI	<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DRD	Doença renal do diabetes
EDM	Edema macular diabético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EUA	Excreção urinária de albumina
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
FN	Fibronectina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	Hemoglobina glicada
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IC	Intervalo de confiança
ICAM1	Molécula de adesão intercelular 1
IDF	<i>International Diabetes Federation</i> (Federação Internacional de Diabetes)
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
INF- γ	Interferon gama
IRAK1	Quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>

miRNA	MicroRNA
miRSNP	Polimorfismo de troca de uma única base em microRNA
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
mRNA	RNA mensageiro
miR-126	MicroRNA-126
miR-146a	MicroRNA-146a
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIK3R2	Subunidade 2 reguladora da fosfoinositídeo-3-quinase
Pre-miRNA	MicroRNA precursor
Pri-miRNA	MicroRNA primário
RAGE	Produtos finais de glicação avançada
RC	Razão de chance
RD	Retinopatia diabética
RDNP	Retinopatia diabética não-proliferativa
RDP	Retinopatia diabética proliferativa
REC	Células endoteliais da retina
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	<i>Real-time quantitative PCR</i> (PCR quantitativo em tempo real)
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de troca de uma única base)
SPRED1	Proteína 1 do domínio 1 de homologia ativado da fosfoproteína estimulada
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
STZ	Estreptozotocina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF α	Taxa de filtração glomerular estimada
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAF6	Fator 6 associado ao receptor de fatores de necrose tumoral
UCP 1 e 2	Proteína desacopladora 1 e 2
UTR	<i>Untranslated region</i> (Região não traduzida)
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
vs	<i>Versus</i>
χ^2	Qui-quadrado
&	E

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	RETINOPATIA DIABÉTICA	12
1.2	MICRORNAS (MIRNAS)	14
1.3	POLIMORFISMOS EM MICRORNAS	20
2	JUSTIFICATIVA	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	ARTIGO CIENTÍFICO	22
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP DO HCPA DO PROJETO FIPE 02-359	56
	ANEXO B – TCLE JÁ APLICADO AOS PACIENTES DO BIOREPOSITÓRIO DE DM1 DO PROJETO FIPE 02-359	57
	ANEXO C – PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP DO HCPA DO PROJETO 18-0008	59
	ANEXO D – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY	60

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) vem se tornando, cada vez mais, um sério problema de saúde pública devido ao aumento de sua prevalência na população. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation - IDF*), atualmente 424,9 milhões de adultos em todo o mundo apresentam algum tipo de DM e a estimativa é que esse número aumente para 628,6 milhões de indivíduos afetados por essa doença em 2045 (IDF, 2017). Estima-se que 87 – 91% dos casos de DM correspondem ao DM tipo 2 (DM2) e 7 – 12% ao DM tipo 1 (DM1) (IDF, 2017). Com relação ao DM1, atualmente existem 1.106.500 crianças e adolescentes (<20 anos de idade) com essa doença, e cerca de 130 mil novos casos por ano (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA, 2018; IDF, 2017). No Brasil, mais de 12 milhões de pessoas vivem hoje com algum tipo de DM, correspondendo a 8,7% da população (IDF, 2017). Em relação ao DM1, o Brasil é o 3º país com maior incidência de DM1 em todo o mundo, com 7.600 novos casos por ano (em crianças com <15 anos de idade) (IDF, 2017).

O DM é um grupo de desordens metabólicas de etiologia múltipla caracterizado pela hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina (ADA, 2018). Essa doença multifatorial é causada pela complexa interação entre diversos fatores de risco ambientais, imunológicos, genéticos e epigenéticos (ADA, 2018). A classificação atual do DM compreende 4 categorias: DM1, DM2, DM gestacional e outros tipos específicos. O DM1 acomete principalmente crianças e adultos jovens e é causado pela destruição autoimune das células-beta pancreáticas mediada por linfócitos T e macrófagos, o que leva a uma deficiência total na secreção de insulina (PIROT et al., 2008; EIZIRIK et al., 2009; BOUCAS et al., 2013; ADA, 2018; PASCHOU et al., 2018). Como consequência, os indivíduos afetados necessitam de tratamento com insulina exógena para a sua sobrevivência (ADA, 2018).

A hiperglicemia crônica em pacientes diabéticos pode provocar lesões estruturais no endotélio vascular e no tecido nervoso que causam danos, disfunções e falhas de vários órgãos e tecidos, levando ao aparecimento das complicações crônicas do DM (ADA, 2018). Estas complicações são divididas em microvasculares [doença renal do diabetes (DRD), retinopatia diabética (RD) e neuropatia diabética] e macrovasculares (doença arterial coronariana, doença vascular periférica e acidente vascular cerebral) e são as causas mais comuns de morbidade e mortalidade em pacientes com diabetes (ADA, 2018). A presença destas complicações geralmente depende do tempo de DM, idade do paciente, hipertensão arterial sistêmica

(HAS), dislipidemia, suscetibilidade genética do paciente ao tipo de complicação e da intensidade e persistência da hiperglicemia (CORREA-GIANNELLA; VIEIRA, 2008; CARPENA et al., 2010).

1.1 RETINOPATIA DIABÉTICA

A RD é a principal causa de novos casos de cegueira em adultos com idade entre 20 e 65 anos (AIELLO et al., 1998; FONG et al., 2004; IDF, 2017) e, apesar dos conhecimentos acumulados nos últimos anos sobre os fatores de risco para RD e da implementação de diferentes estratégias de manejo, a RD ainda é uma complicação crônica frequente e grave. Em cada três pessoas com DM uma delas possui RD (IDF, 2017), e, após 20 anos de duração do DM, quase todos os pacientes com DM1 e mais de 60% dos pacientes com DM2 apresentam algum grau de RD (BOELTER et al., 2003; ESTEVES et al., 2009). No Rio Grande do Sul, um estudo envolvendo pacientes com DM2 relatou que a prevalência de RD é de 48% (SCHEFFEL et al., 2004). Outro estudo multicêntrico brasileiro, em pacientes com DM1, demonstrou que a prevalência de RD foi de 36,1% no Sudeste, 42,9% no Sul, 29,9% no Norte e Nordeste e 41,7% no Centro-Oeste (DRUMMOND et al., 2018).

De modo geral, a RD é classificada em dois grandes grupos: RD não proliferativa (RDNP) e RD proliferativa (RDP). Os estágios iniciais da RD, definidos como RDNP, são caracterizados por diversas anormalidades microvasculares, incluindo a formação de microaneurismas. Em alguns casos ocorre o aumento da permeabilidade dos capilares, podendo haver vazamento de fluido para dentro da mácula, causando edema macular (AIELLO et al., 1998; FONG et al., 2004; VALIATTI et al., 2011). À medida que a doença progride para a forma mais grave, configurada como RDP, ocorre à perda gradual da microvasculatura da retina, levando à isquemia. Essa isquemia induz a proliferação de vasos sanguíneos anômalos e frágeis (neovascularização) que são propensos a hemorragias. Também pode haver crescimento de tecido cicatricial que, quando encolhe, forma uma espécie de cicatriz que distorce a retina e pode provocar seu deslocamento ou, ainda, glaucoma. A hemorragia vítrea, o deslocamento da retina e o tecido fibroso cicatricial contribuem para a perda irreversível da visão (AIELLO et al., 1998; BOELTER et al., 2003; FONG et al., 2004; VALIATTI et al., 2011). A classificação atual da RD pode ser visualizada na **Tabela 1**.

Tabela 1. Classificação internacional da severidade da retinopatia diabética (RD).

Severidade da RD	Achados oftalmoscópicos sobre midríase
Ausência de RD aparente	Ausência de anormalidades.
RD não-proliferativa leve	Apenas microaneurismas.
RD não-proliferativa moderada	Mais que apenas microaneurismas, mas menos que RD severa não-proliferativa.
RD não-proliferativa severa	Sem sinais de RD proliferativa, com qualquer um dos achados abaixo: - Mais de 20 hemorragias intrarretinianas em cada um dos quatro quadrantes; - Veias em rosário em pelo menos 2 quadrantes; - Anormalidades microvasculares intrarretinianas em pelo menos um quadrante.
RD proliferativa	Qualquer dos achados abaixo: - Neovascularização; - Hemorragia vítrea ou pré-retiniana.

Fonte: adaptado de Wilkinson et al., 2003.

Quanto à etiologia da RD, estudos mostram que há um subgrupo de pacientes diabéticos que jamais desenvolve a doença mesmo tendo um controle metabólico ruim. Por outro lado, há indivíduos que desenvolvem essa complicação apesar de terem suas glicemias rigidamente controladas, sugerindo que, além dos fatores de risco ambientais tradicionais (tabagismo, HAS, controle glicêmico e tempo de exposição à hiperglicemia), existe também um forte componente genético influenciando o seu desenvolvimento (WARPEHA; CHAKRAVARTHY, 2003; CORREA-GIANNELLA; VIEIRA, 2008; CARPENA et al., 2010; PETROVIC, 2013). Nesse contexto, estudos de famílias mostraram uma alta agregação familiar na ocorrência de RD, sendo o risco de se desenvolver essa complicação 3 vezes maior em pacientes diabéticos com história familiar de RD comparado a pacientes sem história familiar dessa complicação (PRISCAKOVA et al., 2016).

De fato, diversos estudos já identificaram vários *loci* de suscetibilidade para desenvolvimento ou progressão da RD (WARPEHA; CHAKRAVARTHY, 2003; CORREA-GIANNELLA; VIEIRA, 2008; PRISCAKOVA et al., 2016). Genes candidatos para a RD incluem genes relacionados à inflamação, sistema renina-angiotensina-aldosterona, rotas associadas ao metabolismo da glicose e estresse oxidativo, remodelamento da matriz extracelular, disfunção endotelial e angiogênese (PRISCAKOVA et al., 2016). Entretanto, até o momento, a maioria dos estudos de associação entre polimorfismos genéticos e RD têm relatado resultados conflitantes, com apenas poucos polimorfismos tendo sido confirmados como estando associados a essa complicação em diferentes populações (HAMPTON et al.,

2015). Assim, a identificação de novos polimorfismos genéticos associados à RD representa um campo promissor por poder permitir um melhor entendimento da patogênese dessa complicação, bem como poder levar ao desenvolvimento de tratamentos específicos para evitar ou diminuir a perda visual dos pacientes com DM.

A maior parte dos estudos de associação genética tem avaliado a ocorrência de polimorfismos nas regiões codificantes dos genes (éxons) ou na região promotora (não-codificante). Porém, evidências recentes sugerem que polimorfismos em outras regiões não-codificantes de proteínas, como regiões alvo dos microRNAs (miRNAs) na 3'UTR (*untranslated region*) ou em genes codificadores de miRNAs, podem ter um efeito significativo na patogênese de diversas doenças (NATARAJAN et al., 2012).

1.2 MICRORNAS (MIRNAS)

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA fita simples de 19 – 25 nucleotídeos, não-codificantes de proteína, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais (KATO et al., 2013). Lin-4 foi o primeiro miRNA identificado, em 1993, sendo associado à regulação do desenvolvimento larval no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (LEE et al., 1993). Os miRNAs atuam ligando-se principalmente à região 3'UTR do RNA mensageiro (mRNA) alvo, levando ao bloqueio da tradução e/ou degradação do mRNA (BUTZ et al., 2016; ASSMANN et al., 2017b). Mais de 2.400 miRNAs já foram descritos em humanos e estima-se que eles regulem a expressão de 60% dos genes codificantes de proteínas, consequentemente controlando diversos processos biológicos e patológicos (BUTZ et al., 2016; ASSMANN et al., 2017b).

A especificidade de ligação do miRNA com um dado mRNA alvo está ligada principalmente a uma pequena sequência de nucleotídeos, de aproximadamente 8 pares de bases, chamada de *seed sequence*. A variação no grau de complementariedade dessas sequências permite que um único miRNA se ligue a diversos mRNA e, da mesma forma, cada mRNA pode ser regulado por vários miRNAs (FILIPOWICZ et al., 2008; KANTHARIDIS et al., 2011).

Considerando que os miRNAs modulam diversos processos fisiológicos e a patofisiologia de diversas doenças, é reconhecido que existe a necessidade de se identificar os miRNAs (e seus alvos) associados à RD, pois isto propiciaria a identificação de novos biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico dessa complicação, bem como poderia sugerir novos alvos terapêuticos (KANTHARIDIS et al., 2011; NATARAJAN et al., 2012).

Entretanto, até o momento, poucos estudos avaliaram o envolvimento de miRNAs na patogênese da RD em humanos (KANTHARIDIS et al., 2011; JOGLEKAR et al., 2016). Os principais estudos que investigaram o papel de miRNAs na RD em pacientes com DM1 ou DM2 estão descritos na **Tabela 2**.

Kovacs et al. (2011) avaliaram um perfil de expressão de miRNAs na retina de ratos diabéticos (induzido por estreptozotocina – STZ), 3 meses após a indução de DM, e observaram que 86 miRNAs foram diferencialmente expressos na retina de ratos diabéticos comparado a ratos controles. Um destes miRNAs diferencialmente expressos foi o miRNA-146a (miR-146a), o qual regula negativamente a expressão do fator de transcrição nuclear kappa B (Nf- κ b), que tem um papel importante no desenvolvimento da RD, sugerindo que o miR-146a é um potencial alvo terapêutico para o tratamento dessa complicação (KOVACS et al., 2011).

Tabela 2. MiRNAs associados à retinopatia diabética.

Estudo	Amostra	miRNA (técnica)/ tecido	Resultados
Barutta et al. (2017)	312 pacientes com DM1 e DRD + RD (casos) e 143 pacientes com DM1 e sem nenhuma complicação (controles)	377 miRNAs (macroarray) / soro	Expressão de miR-126 foi menor nos casos comparado aos controles.
Gomaa et al. (2017)	29 pacientes com RDP e 30 controles	miR-200b (RT-qPCR) / vítreo	Expressão de miR-200b foi maior nos casos do que nos controles.
Hirota et al. (2015)	4 pacientes com RDP e 4 controles	168 miRNAs (miRNA PCR Panel) / vítreo	miR-15a, miR-320a, miR-320b, miR-93, miR-29a e miR-423-5p foram mais expressos no vítreo de pacientes com RDP.
Li et al. (2017)	255 casos com RD e 253 controles sem DM	miR-200b (RT-qPCR) / soro	Expressão de miR-200b foi menor nos casos.
Ma et al. (2017)	5 pacientes com DM2 e RD (casos) e 5 pacientes com DM2, mas sem RD (controles)	Centenas de miRNAs (microarray) / soro	miR-3939 e miR-1910-3p foram associados com RD, mas o resultado não foi validado na amostra de validação.

Continua.

Conclusão.

Estudo	Amostra	miRNA (técnica)/ tecido	Resultados
Qin et al. (2017)	44 pacientes com RDNP, 39 com RDP e 59 controles saudáveis	miR-126 (RT-qPCR) / soro	miR-126 foi diminuído em pacientes com RDP comparado a pacientes com RDNP. Não houve diferenças na expressão entre RDNP e controles.
Qing et al. (2014)	90 casos com RDP, 90 casos com RDNP e 90 controles	667 miRNAs (macroarray) / soro	miR-21, miR-181c e miR-1179 foram aumentados em casos com RDP (vs. pacientes com RDNP).
Zampetaki et al. (2016)	62 pacientes com RDNP, 93 com RDP e 145 controles	29 miRNAs (TaqMan miRNA Assays) / soro	miR-27b e miR-320a foram associados com a incidência e progressão da RD.

Fonte: elaborada pela autora. DM: diabetes mellitus; DRD: doença renal do diabetes; RD: retinopatia diabética; RDNP: retinopatia diabética não-proliferativa; RDP: retinopatia diabética proliferativa; RT-qPCR: *real-time quantitative PCR*.

De acordo com o papel protetor do miR-146a contra o desenvolvimento da RD, Zhuang et al. (2017) demonstraram que a injeção de um vetor lentiviral expressando esse miRNA no vítreo de ratos Sprague-Dawley com DM induzido por STZ aumentou a expressão desse miRNA na retina ao mesmo tempo que diminuiu a expressão de algumas de suas moléculas alvos (proteína 10 do domínio de recrutamento de caspase – Card10, quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1 – Irak1, e fator 6 associado ao receptor de fatores de necrose tumoral – Traf6). Isto levou à inibição do aumento da expressão do *Nf-κB* e da molécula de adesão intercelular 1 (*Icam1*), bem como preveniu os defeitos funcionais associados com o desenvolvimento da RD. Outro estudo mostrou que a hiperglicemia diminuiu os níveis de miR-146a em células da retina, causando o aumento de fibronectina (FN), uma proteína envolvida na produção de matriz extracelular (FENG et al., 2011). Além disso, a transfecção de um mímico de miR-146a preveniu o aumento de FN induzido por glicose em células endoteliais da retina. Retinas de ratos com DM1 (induzido por STZ) ou DM2 (ratos db/db) mostraram níveis diminuídos desse miRNA (FENG et al., 2011).

Ye e Steinle (2016) também demonstraram que a expressão de miR-146a foi diminuída em células endoteliais da retina humana incubadas com altas concentrações de glicose. A super-expressão desse miRNA usando um mímico reduziu os níveis de receptores do tipo Toll 4 (TLR4), NF-κB e fator de necrose tumoral (TNF) em células incubadas com glicose alta, corroborando que esse miRNA é um potencial alvo terapêutico para reduzir a

inflamação em células da retina através da inibição das suas moléculas alvos. Outro estudo desse mesmo grupo de pesquisa mostrou que a transfecção de células endoteliais da retina com um mimico do miR-146a reduziu os níveis de interleucina-6 (IL-6), transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) após incubação com glicose alta, levando à diminuição da apoptose dessas células (YE; STEINLE, 2017).

Outro miRNA que também vem sendo associado com a RD é o miRNA-126 (miR-126), o qual parece estar envolvido na modulação da integridade vascular, proliferação e angiogênese, regulando a resposta das células endoteliais ao VEGF, um importante fator de crescimento pró-angiogênico associado à RD (FISH et al., 2008; WANG et al., 2008). Esse miRNA atua inibindo a proteína 1 do domínio 1 de homologia ativado da fosfoproteína estimulada (SPRED1) e a subunidade 2 reguladora da fosfoinositídeo-3-quinase (PIK3R2), os quais codificam proteínas inibidoras do VEGF; dessa forma, aumentando os níveis de VEGF nas células endoteliais (FISH et al., 2008). Entretanto, o papel do miR-126 na regulação do VEGF ainda não está definido visto que outro estudo demonstrou que tratamento com um mimico desse miRNA bloqueou VEGF e metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) em células da retina de macacos submetidas à hipóxia (YE et al., 2014). Bai et al. (2011) relataram que miR-126 foi diminuído na retina de camundongos com retinopatia induzida por oxigênio e que a injeção intra-vítreo de um plasmídeo expressando esse miRNA reduziu a neovascularização da retina através do bloqueio da proteína quinase 38 (p38) e quinases reguladas por sinal extracelular (Erks) nesse modelo murino de RD.

Em humanos, o miR-126 foi diminuído no soro de pacientes com RDP (n = 39) comparado a pacientes com RDNP (n = 42) e pacientes diabéticos sem essa complicação (n = 44) da China (QIN et al., 2017). De acordo com este estudo, Barutta et al. (2017) também observaram níveis diminuídos de miR-126 no soro de pacientes com DM1 e complicações microvasculares (principalmente RD + DRD) comparado a pacientes diabéticos sem nenhuma complicação. A presença desse miRNA foi associada com proteção contra RDP [Razão de chances (RC) = 0,85, intervalo de confiança (IC) 95% 0,75 – 0,96, ajustando-se para idade, sexo e hemoglobina glicada (HbA1c)], sugerindo que este miRNA pode ser um biomarcador não-invasivo para o diagnóstico precoce de RDP.

1.3 POLIMORFISMOS EM MICRORNAS

Como já comentado, a maior parte dos estudos de associação tem avaliado a ocorrência de polimorfismos nas regiões codificantes dos genes ou nas regiões promotoras. Porém, análises *in silico* demonstram que variações em regiões não-codificantes alvo de miRNAs (3'UTR) podem alterar a expressão de genes já associados com DM1 ou suas complicações (JONG et al., 2013). Além disso, polimorfismos de troca de uma única base (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs) também podem acontecer em genes de miRNAs (miRSNPs), afetando o processamento dos pri-miRNAs (miRNAs primários), pre-miRNAs (miRNAs precursores) e/ou dos miRNAs maduros ou, ainda, modificando a *seed sequence*, o que pode afetar a ligação do miRNA aos seus mRNA alvos (KROLICZEWSKI et al., 2018). Isso poderia alterar perfis celulares de expressão de genes, o que, por sua vez, afetaria a suscetibilidade a diversas doenças (NATARAJAN et al., 2012).

Até o momento, mais de 240 miRSNPs foram descritos em genes de miRNAs (site miRNA-SNP; <http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP2>); entretanto, até o momento, poucos estudos avaliaram a associação entre miRSNPs e a RD (MCAULEY et al., 2015; KAIDONIS et al., 2016). O miRSNP rs4636297 (G/A) está localizado em uma região flanqueadora do *miR-126* e o alelo G deste polimorfismo diminui o processamento do *pri-miR-126* para o *pre-miR-126*, resultando em uma menor expressão do *miR-126* maduro e, consequentemente, modificando a expressão de VEGF; enquanto o alelo A é menos efetivo nessa diminuição (HARNPRASOPWAT et al., 2010). McAuley et al. (2015) relataram que o alelo A do miRSNP rs4636297 foi significativamente associado com RDP ou RDNP grave (n = 163) quando comparado a pacientes sem RD ou com RDNP leve de uma população da Austrália (RC = 2,02, IC 95% 1,22 – 3.35, p = 0,006).

Outro miRSNP que vem sendo investigado em relação à RD, é o miRSNP rs2910164 (G/C) que está localizado dentro da *seed sequence* do *miR-146a*. O alelo mais raro desse polimorfismo (C) foi associado com alterações na estrutura do *pre-miR-146a* (LIU et al., 2012; ASSMANN et al., 2017a), modificando a interação do miR-146a maduro com seus mRNA alvos (JAZDZEWSKI et al., 2008; CAMMAERTS et al., 2015). Assim, dada a função desse miRNA na regulação da inflamação e apoptose mediadas por NF-κB, alterações na sua sequência podem ter implicações funcionais na patogênese das complicações microvasculares do DM, incluindo na RD (KAIDONIS et al., 2016). Kaidonis et al. (2016) analisaram o miRSNP rs2910164 em pacientes com DM1 (n = 733) ou DM2 (n = 2.215) divididos de acordo com a presença de DRD (n = 890), RDP (n = 731) ou edema macular diabético (EMD,

n = 1.026) provenientes da Austrália ou Reino Unido. Os autores observaram uma associação significativa entre o alelo C desse polimorfismo e risco para DRD no grupo de pacientes com DM1 (RC 1,93, IC 95% 1,23 – 3,03) e para EMD no grupo de pacientes com DM2 (RC 1,25, IC 95% 1,03 – 1,53). Nenhuma associação foi observada com RDP no grupo de pacientes com DM1.

2 JUSTIFICATIVA

O DM vem se tornando um grave problema de saúde pública, uma vez que possui acentuada morbidade e mortalidade e também devido a repercussões econômicas e sociais decorrentes do impacto de suas complicações crônicas (como a RD), as quais comprometem a qualidade de vida e a produtividade dos indivíduos afetados, além dos elevados custos requeridos para seu tratamento. A RD é a principal causa de novos casos de cegueira em adultos com idade entre 20 e 65 anos e, apesar dos conhecimentos acumulados nos últimos anos sobre os fatores de risco para RD e da implementação de diferentes estratégias de manejo, a RD ainda é uma complicação crônica frequente e grave. Após 20 anos de duração do DM, quase todos os pacientes com DM1 e mais de 60% dos pacientes com DM2 apresentam algum grau de RD. Dessa forma, a identificação de novos polimorfismos genéticos associados à RD representa um campo promissor por poder permitir um melhor entendimento da patogênese dessa complicação, bem como poder levar ao desenvolvimento de tratamentos específicos para evitar ou diminuir a perda visual dos pacientes com DM.

Evidências recentes mostram que os miRNAs estão envolvidos na patogênese da RD por meio de sua capacidade de regular os níveis de expressão de diversos genes que atuam em rotas de diferenciação celular, angiogênese, apoptose, estresse oxidativo, entre outras. Neste contexto, miRSNPs podem alterar a biogênese desses miRNAs ou suas ligações aos seus mRNAs alvos, conseqüentemente, podendo modificar a expressão dos genes alvos e a suscetibilidade à RD. Entretanto, até o momento, apenas dois estudos avaliaram a associação entre os miRSNPs rs2910164 no *miR-146a* e rs4636297 no *miR-126* e a RD.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação do miRSNP rs4636297 (G/A) no gene *miRNA-126* e do miRSNP rs2910164 (G/C) no gene *miRNA-146a* com a RD em pacientes com DM1.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Comparar a frequência do miRSNP rs4636297 (G/A) e do miRSNP rs2910164 (G/C) entre pacientes com DM1 sem RD ou com RDNP leve e mais de 10 anos de DM (controles) e pacientes com DM1 e com RDP ou RDNP grave ou moderada (casos);
- b) Avaliar se os miRSNPs de interesse estão associados a alguma característica clínica ou laboratorial de risco para RD, como níveis de HbA1c, perfil lipídico, presença de HAS e tempo de DM1.

RESUMO

25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

Introdução: Diversos estudos sugerem que fatores genéticos tenham um importante papel no desenvolvimento da retinopatia diabética (RD), uma complicação crônica do diabetes mellitus (DM); porém, os resultados até o momento são inconclusivos. Atualmente vem se estudando polimorfismos em genes codificadores de microRNAs, uma vez que podem levar a alterações funcionais no microRNA, interferindo na patogênese de diversas doenças, dentre elas a RD. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a associação do polimorfismo rs4636297 (G/A) no *miR-126* e do polimorfismo rs2910164 (G/C) no *miR-146a* com a RD em pacientes com DM tipo 1. **Metodologia:** Foram analisados 196 casos com RD proliferativa ou RD não-proliferativa moderada ou grave e 219 controles com DM1, sem essa complicação ou com RD não-proliferativa leve. Os polimorfismos foram genotipados por PCR em tempo real. **Resultados:** O alelo A do polimorfismo rs4636297 no gene *miR-126* foi associado com proteção para RD, sendo mais fortemente associado no modelo de herança aditivo (RC = 0,080; IC 95% 0,018 – 0,362; p = 0,001). As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs2910164 no gene *miR-146a* não diferiram entre casos e controles. **Conclusão:** O genótipo A/A do polimorfismo rs4636297 no gene *miR-126* parece estar associado com proteção para RD.

54 **INTRODUÇÃO**

55

56 A retinopatia diabética (RD) é uma das mais importantes complicações crônicas
57 microvasculares do diabetes mellitus (DM), sendo a principal causa de novos casos de
58 cegueira em adultos com idade entre 20 e 65 anos (AIELLO et al., 1998; FONG et al., 2004;
59 IDF, 2017). A RD é uma desordem da vascularização retiniana, sendo classificada como não-
60 proliferativa (RDNP) em seus estágios iniciais, que são caracterizados pela presença de
61 microaneurismas. À medida que a doença progride para a forma mais grave, é classificada
62 como RD proliferativa (RDP), associada à presença de hemorragia vítrea e/ou
63 neovascularização (WILKINSON et al., 2003; VALIATTI et al., 2011).

64 A RD é uma doença multifatorial cujo desenvolvimento e progressão resultam da
65 complexa interação entre os fatores de risco clínicos, fatores ambientais e fatores genéticos.
66 Nesse sentido, diversos estudos já demonstraram que a RD está associada a polimorfismos em
67 vários genes, tais como: receptor para produtos finais de glicação avançada (*RAGE*),
68 interleucina-10 (*IL-10*), receptor do tipo Toll 4 (*TLR4*), interleucina-8 (*IL-8*), proteína 5 do
69 sistema complemento (*C5*), proteína desacopladora 1 e 2 (*UCP1* e *UCP2*) e fator de
70 crescimento endotelial vascular (*VEGF*) (CRISPIM et al., 2010; BRONDANI et al., 2012;
71 PRISCAKOVA et al., 2016; XU et al., 2016; DONG et al., 2017; TAO et al., 2017; XIE et al.,
72 2017; ZAHARIEVA et al., 2017; PEREIRA et al., 2018). Além disso, estudos mais recentes
73 vêm investigando a associação de polimorfismos em genes codificadores de microRNAs
74 (miRSNPs) com diversas patologias, dentre as quais está a RD (NATARAJAN et al., 2012).

75 MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes que regulam
76 negativamente a expressão gênica pareando parcialmente com a região 3' não traduzida de
77 seus RNAs mensageiros (mRNAs) alvo, levando à repressão da tradução e/ou degradação do
78 transcrito (KATO et al., 2013). Até o momento, poucos estudos avaliaram o envolvimento de

79 miRNAs na patogênese da RD em humanos (KANTHARIDIS et al., 2011; JOGLEKAR et
80 al., 2016). Kovacs et al. (2011) demonstraram que o miR-146a regula negativamente a
81 expressão do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), o qual tem um papel importante
82 no desenvolvimento da RD, sugerindo que o miR-146a é um potencial alvo terapêutico para o
83 tratamento dessa complicação. O miR-146a também é descrito como sendo um regulador da
84 resposta imune inata, via receptores do tipo Toll (NAHID et al., 2009; NAHID et al., 2011;
85 MEISGEN et al., 2014), e adaptativa, via células T reguladoras (LU et al., 2010). Ainda, esse
86 miRNA está envolvido na regulação negativa da produção de fibronectina (FENG et al., 2011;
87 KAIDONIS et al., 2016).

88 Outro miRNA que também vem sendo associado com a RD é o miRNA-126, o qual
89 parece estar envolvido na modulação da integridade vascular, proliferação e angiogênese,
90 regulando a resposta das células endoteliais ao VEGF, um importante fator de crescimento
91 pró-angiogênico associado à RD (FISH et al., 2008; WANG et al., 2008; YE et al., 2014).
92 Também, já foi demonstrado que esse miRNA regula a resposta inflamatória, diminuindo a
93 aderência dos leucócitos às células endoteliais através da regulação negativa da expressão da
94 molécula de adesão celular vascular-1 (HARRIS et al., 2008).

95 Dessa forma, visto que o miR-126 e o miR-146a parecem estar envolvidos na
96 patogênese da RD, o presente estudo tem como objetivo investigar a associação dos
97 polimorfismos rs2910164 no *miR-146a* e rs4636297 no *miR-126* com a RD em pacientes com
98 diabetes mellitus tipo 1 (DM1) de uma população do sul do Brasil.

99

100 **MATERIAIS E MÉTODOS**

101

102 *Grupos de estudo, análises clínicas e laboratoriais*

103

104 Este estudo de caso-controle foi elaborado de acordo com as diretrizes STROBE e
105 STREGA para estudos de associação (VON ELM et al., 2008; LITTLE et al., 2009). A
106 amostra de casos compreendeu 196 pacientes com DM1 e RD (RDP ou RDNP grave ou
107 moderada) recrutados no Ambulatório do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas
108 de Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brasil) entre janeiro de 2005 e dezembro de 2013. O
109 grupo controle foi composto por pacientes com DM1 há mais de 10 anos e sem diagnóstico de
110 RD ou com RDNP leve, totalizando 219 pacientes, recrutados no mesmo local dos casos. Os
111 pacientes com RDNP leve foram incluídos no grupo dos controles, uma vez que esse estágio
112 da doença é de difícil diagnóstico e na maioria dos casos os pacientes acabam regredindo,
113 deixando de ter essa complicação (AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY,
114 2017).

115 Todos os pacientes foram diagnosticados como portadores de DM1 de acordo com as
116 Diretrizes da *American Diabetes Association* – ADA (ADA, 2018). A doença renal do
117 diabetes (DRD) foi diagnosticada conforme as recomendações da *Kidney Disease Improving*
118 *Global Outcomes* (KDIGO) (ANDRASSY, 2013), usando os níveis de excreção urinária de
119 albumina (EUA) e a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe), calculada pela equação
120 *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) (LEVEY et al., 2009). O
121 diagnóstico da RD foi feito por meio da fundoscopia direta (exame de fundo de olho) e
122 classificada, considerando o olho mais gravemente afetado, como: ausente, RDNP (leve,
123 moderada ou grave) ou RDP, conforme a escala desenvolvida pela *Global Diabetic*
124 *Retinopathy Group* (WILKINSON et al., 2003).

125 O grupo étnico foi definido com base na autoclassificação e a distribuição étnica entre
126 as amostras foi a seguinte: 10,3% de pacientes negros no grupo caso e 10,0% no grupo
127 controle ($p > 0,999$). Todos os sujeitos assinaram o termo de consentimento livre e
128 esclarecido.

129 Um questionário padrão foi usado para coletar informações sobre idade, idade no
130 diagnóstico de DM, duração do DM1 e medicamentos utilizados. Todos os pacientes foram
131 submetidos a exames clínicos e laboratoriais, como descrito em um estudo prévio do grupo
132 (ASSMANN et al., 2014). Além disso, amostras de soro e de plasma foram coletadas após 12
133 horas de jejum para análises laboratoriais (ASSMANN et al., 2014).

134

135 *Genotipagem*

136

137 O DNA total foi extraído a partir de leucócitos do sangue periférico utilizando-se o
138 método descrito por Lahiri & Nurnberger Júnior. (LAHIRI; NURNBERGER, 1991). A
139 análise dos miRSNPs rs4636297 (G/A) no *miR-126* e rs2910164 (G/C) no *miR-146a* foi feita
140 através de ensaios de discriminação alélica por PCR em tempo real utilizando-se *primers* e
141 sondas específicos para cada polimorfismo e contidos no *TaqMan SNP Genotyping Assay 20x*
142 (Thermo Fisher Scientific) para rs2910164 (*assay ID*: C__15946974_10), e no *Custom*
143 *TaqMan Genotyping Assay 20x* (Thermo Fisher Scientific) para o rs4636297 (*assay ID*:
144 ANNKU2W). A reação de PCR em tempo real foi realizada em uma placa de 384 poços, em
145 um volume total de 5 µl por poço usando-se 2 ng de DNA (concentração final de 0,4 ng/µl),
146 *TaqPath ProAmp Master Mix 1x* e *TaqMan SNP Genotyping Assay 1x*. As placas foram então
147 colocadas em um termociclador para PCR em tempo real (*Viia7 Real Time PCR System*;
148 Thermo Fisher Scientific) e aquecidas por 10 min a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 95°C por
149 15 s e 62°C por 1 min. Os miRSNPs rs4636297 (G/A) no *miR-126* e rs2910164 (G/C) no
150 *miR-146a* foram selecionados a partir de estudos na literatura que mostraram associação
151 desses miRNAs com a patogênese da RD (KOVACS et al., 2011; MOURA et al., 2014;
152 MCAULEY et al., 2015; KAIDONIS et al., 2016; BARUTTA et al., 2017).

153

154 *Análises estatísticas*

155

156 As frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos estudados nos genes do *miR-*
157 *126* e do *miR-146a* foram estimadas por contagem direta dos alelos e o equilíbrio de Hardy-
158 Weinberg (EHW) foi testado pelo teste de qui-quadrado (χ^2). As distribuições alélicas e
159 genótípicas entre os grupos de indivíduos foram avaliadas pelo teste de χ^2 . Uma medida de
160 magnitude de efeito foi calculada através da razão de chances (RC) e intervalo de confiança
161 de 95% (IC 95%). Além disso, também comparamos genótipos agrupados em diferentes
162 modelos de herança (aditivo, recessivo e dominante) entre amostras de casos e controles.

163 As variáveis contínuas foram primeiramente testadas para normalidade da distribuição
164 de médias através do teste de *Kolmogorov-Smirnov*. As análises estatísticas das variáveis
165 quantitativas de distribuição normal foram realizadas utilizando o teste *t* de *Student*, de acordo
166 com o apropriado. Já as variáveis que não apresentaram distribuição normal foram
167 transformadas para escala logarítmica antes das análises e comparadas entre os grupos
168 usando-se o teste acima, ou utilizando o teste de *Mann-Whitney U*, caso a transformação para
169 escala logarítmica não tenha normalizado a variável. Análise de regressão logística foi
170 aplicada para avaliar se os polimorfismos estudados estão associados independentemente com
171 RD, controlando-se para co-variáveis de confusão. Os resultados foram expressos como
172 média \pm desvio padrão (DP), mediana (valores do percentil 25% – 75%) ou porcentagem. Os
173 cálculos do poder do estudo (programa OpenEpi – www.openepi.com) mostraram que este
174 estudo tem um poder de aproximadamente 80% e um nível de significância de 0,05 para
175 detectar um RC de 1,6 ou superior, ou para detectar uma RC de 0,55 ou inferior (para a
176 presença dos alelos menos frequentes de cada polimorfismo). Todas as análises foram
177 realizadas com o software SPSS 18.0 (SPSS, Chicago, IL). Valores de $p < 0,05$ foram
178 considerados significativos.

179

180 **RESULTADOS**

181

182 *Descrição da amostra*

183

184 As características clínicas e laboratoriais dos controles (pacientes com DM1 há mais
185 de 10 anos e sem RD ou com RDNP leve) e casos (pacientes com DM1 e RDP ou RDNP
186 grave ou moderada) estão descritas na **Tabela 1**. Não houve diferença entre casos e controles
187 em relação à distribuição étnica e de gênero. No grupo caso, a idade média foi de $42,1 \pm 12,3$
188 anos e o tempo de DM1 foi de $23,6 \pm 8,9$ anos, enquanto no grupo controle a idade foi de $23,6$
189 $\pm 8,9$ e o tempo de DM foi $18,8 \pm 8,1$ ($p < 0,001$ para ambas as comparações). Além disso,
190 conforme o esperado, pode-se observar uma maior prevalência de hipertensão e de DRD nos
191 pacientes com RD comparado ao grupo controle (valores de $p = 0,001$ e $p < 0,001$,
192 respectivamente). Da mesma forma, os níveis de hemoglobina glicada, triglicérides,
193 colesterol, creatinina e taxa de filtração glomerular estimada foram aumentados nos casos
194 (todos os $p \leq 0,001$).

195

196 *Distribuições genotípicas e alélicas*

197

198 As distribuições genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs4636297 (G/A) no gene
199 *miR-126* e rs2910164 (G/C) no gene *miR-146a* estão de acordo com o que é predito pelo
200 EHW no grupo controle ($p > 0,05$). As frequências dos polimorfismos rs4636297 e rs2910164
201 em casos e controles estão descritas na **Tabela 2**. As frequências alélicas do polimorfismo
202 rs4636297 não diferiram entre casos e controles ($p = 0,101$). Entretanto, as frequências
203 genotípicas desse polimorfismo foram diferentes entre os grupos, havendo menor frequência

204 do genótipo G/A nos casos com RD ($p = 0,047$). Além disso, a presença do alelo A (G/A +
205 A/A) foi associada com proteção para RD no modelo de herança dominante (RC = 0,651; IC
206 95% 0,427 – 0,991; $p = 0,046$).

207 Após o ajuste para co-variáveis (hemoglobina glicada, presença de hipertensão,
208 presença de DRD e níveis de colesterol), as frequências genótípicas do polimorfismo
209 rs4636297 foram independentemente associadas com proteção para RD (G/A: $p = 0,016$;
210 A/A: $p = 0,002$). O alelo A também foi associado com proteção para RD considerando os três
211 modelos de herança analisados (recessivo: $p = 0,023$; aditivo: $p = 0,001$; e dominante: $p =$
212 0,003), ajustando-se para as mesmas co-variáveis descritas acima. A maior proteção foi
213 observada no modelo aditivo (RC = 0,080, IC 95% 0,018 – 0,362).

214 Em relação ao polimorfismo rs2910164 no gene *miR-146a*, as frequências genótípicas
215 e alélicas não diferiram significativamente entre casos e controles ($p = 0,308$ e $p = 0,977$).
216 Esse polimorfismo também não foi associado com RD quando se analisou os diferentes
217 modelos de herança (todos os $p > 0,05$). Ainda, após regressão logística com ajuste para co-
218 variáveis (hemoglobina glicada, presença de hipertensão, presença de DRD e níveis de
219 colesterol), os resultados negativos se mantiveram (**Tabela 2**).

220 Em uma análise exploratória, características clínicas e laboratoriais no grupo de casos
221 foram comparadas entre os genótipos dos polimorfismos de interesse (no modelo aditivo),
222 (**Tabelas 3 e 4**). Para o polimorfismo rs4636297 no gene *miR-126*, nenhuma característica
223 analisada diferiu significativamente entre portadores do alelo menor (A/A) vs. indivíduos com
224 o genótipo G/G (**Tabela 3**). Já para o polimorfismo rs2910164 no gene *miR-146a*, dentre as
225 características analisadas, apenas o colesterol foi significativamente diferente entre os
226 indivíduos com o genótipo G/G vs. portadores do alelo C (C/C), havendo maiores níveis de
227 colesterol nos portadores do alelo C ($p = 0,023$; **Tabela 4**).

228

DISCUSSÃO

229

230

231 O miR-126 e o miR-146a parecem estar associados com vias e mecanismos
232 importantes relacionados à patogênese da RD (HARRIS et al., 2008; WANG et al., 2008;
233 KOVACS et al., 2011). Entretanto, poucos estudos investigaram a associação entre
234 polimorfismos genéticos nos genes codificadores desses dois miRNAs e sua influência no
235 desenvolvimento desta importante complicação crônica do DM (MCAULEY et al., 2015;
236 KAIDONIS et al., 2016). Assim, nós investigamos a associação dos polimorfismos rs2910164
237 no gene do *miR-146a* e rs4636297 no gene do *miR-126* e a RD em pacientes com DM1 de
238 uma população brasileira. Os resultados apresentados indicam que os genótipos G/A e A/A
239 do polimorfismo rs4636297 do *miR-126* estão associados com proteção para a RD. Já, o
240 polimorfismo estudado no *miR-146a* parece não estar associado com RD.

241

242

243

244

245

246

247

248

249

Em contraste com nossos resultados, McAuley et al. (2015) investigaram a associação
do polimorfismo rs4636297 no *miR-126* com a RD em pacientes com DM1 ou DM tipo 2
(DM2) de uma população australiana e demonstraram que o alelo A está associado com risco
para RDP e RDNP grave nos modelos de herança dominante (RC = 2,439; IC 95% 1,189 –
5,004) e aditivo (RC = 2,001; IC 95% 1,186 – 3,375). Ainda, o alelo G do miRSNP
rs4636297 parece diminuir o processamento do *miR-126 primário (pri-miR-126)* para o *miR-126 precursor (pre-miR-126)*, resultando numa menor expressão do *miR-126 maduro*,
enquanto que o alelo A é menos efetivo na inibição da conversão do *pri-miR-126* em *pre-miR-126* (HARNPRASOPWAT et al., 2010).

250

251

252

253

A expressão desse miRNA em pacientes com DM e complicações do DM também já
foi avaliada. Barutta et al. (2017) identificaram uma diminuição da expressão do miR-126 em
indivíduos europeus com alguma complicação do DM (RD, DRD, doença cardiovascular ou
neuropatia diabética) quando comparado ao grupo controle. Em relação à RDP, uma redução

254 de 25% no risco para esta patologia foi observada quando a expressão do miR-126 foi
255 aumentada. Outro estudo feito em uma população chinesa, mostrou uma diminuição da
256 expressão do miR-126 no soro dos pacientes com DM e RD conforme o grau de
257 comprometimento da retina, sendo diferencialmente expresso entre RDP e RDNP. Ainda, esse
258 estudo sugere que a expressão do miR-126 poderia ser utilizada como diagnóstico para o tipo
259 de RD (QIN et al., 2017). Do mesmo modo, a presença do miR-126 já foi descrita como
260 estando envolvida na proteção para diversas patologias devido ao papel desse miRNA na
261 regulação da inflamação (ASGEIRSDOTTIR et al., 2012; KIM et al., 2012; BANERJEE et
262 al., 2013; TAI et al., 2014; YUAN et al., 2016; CERUTTI et al., 2017; XIANG et al., 2017;
263 WANG et al., 2018; WU; ZHANG, 2018)

264 Estudos funcionais também demonstram a atuação do miR-126 na patogênese da RD,
265 estando este envolvido no processo de neovascularização e na regulação da resposta imune.
266 Esse miRNA atua na regulação da integridade vascular, proliferação e angiogênese,
267 modulando a resposta das células endoteliais ao VEGF, que é um importante fator de
268 crescimento pró-angiogênico (FISH et al., 2008; WANG et al., 2008; YE et al., 2014). Nessa
269 sinalização, o miR-126 atua como um inibidor da proteína 1 do domínio 1 de homologia
270 ativado da fosfoproteína estimulada (SPRED1) e da subunidade 2 reguladora da
271 fosfoinositídeo-3-quinase (PIK3R2), proteínas inibidoras do VEGF; podendo, assim, ser
272 considerado um promotor da ativação do VEGF (FISH et al., 2008; WANG et al., 2008; YE
273 et al., 2014).

274 O miR-126 também diminui a aderência dos leucócitos às células endoteliais,
275 regulando negativamente a expressão da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1),
276 diminuindo as interações leucocitárias e, assim, reduzindo a resposta inflamatória (HARRIS
277 et al., 2008; MOURA et al., 2014). Em camundongos com retinopatia, foi demonstrado que o
278 miR-126 reduziu o dano à barreira hemato-retiniana através da diminuição da expressão da

279 Vcam-1 e, ainda, foi capaz de reduzir a apoptose das células endoteliais da retina, o
280 vazamento vascular retiniano e a permeabilidade da retina, além de proteger as células de
281 Müller da retina da hipóxia por meio da via de sinalização do transdutor de sinal e ativador de
282 transcrição 3 (Stat3) (BAI et al., 2017).

283 Em relação aos nossos resultados, embora a RD não seja considerada uma doença
284 inflamatória, os estudos têm descrito que os leucócitos exercem participação ativa na oclusão
285 da microvasculatura retiniana, assim como na hipoperfusão e no extravasamento vascular
286 (BOSCO et al., 2005). Já foi observada também uma significativa associação entre o aumento
287 da adesão dos leucócitos ao endotélio, com o aumento da permeabilidade do capilar e com o
288 extravasamento de proteínas, sugerindo a participação dos leucócitos na quebra da barreira
289 hemato-retiniana; o que levaria, posteriormente, à neovascularização (BOSCO et al., 2005).
290 Nesse sentido, as moléculas de adesão celular vascular 1 são expressas nos endotélios
291 ativados por citocinas (como o fator de necrose tumoral – TNF – e a interleucina-1 beta – IL-
292 1 β). Essas moléculas de adesão interagem com as β -integrinas (CD11/CD18) presentes nos
293 leucócitos ativados, produzindo firme adesão e migração leucocitária (BOSCO et al., 2005;
294 GUSTAVSSON et al., 2010).

295 Corroborando esse mecanismo, estudos em pacientes (realizados tanto no soro como
296 na cavidade vítrea) têm demonstrado uma associação entre o aumento da concentração das
297 moléculas de adesão (como VCAM-1) e a presença de RD, assim como com o grau de
298 severidade dessa complicação (BARILE et al., 1999; ADAMIEC-MROCZEK;
299 OFICJALSKA-MLYNCZAK, 2008; SHARMA et al., 2015; BLUM et al., 2018). Nesse
300 contexto, a associação encontrada entre a presença do alelo A (G/A + A/A) com proteção para
301 a RD está de acordo com a função desse miRNA na modulação da resposta inflamatória; de
302 modo que quando se tem a presença do alelo A, pode haver uma maior expressão do miR-126
303 maduro. Então, o miR-126 ativo conseguiria inibir a expressão de VCAM-1 e,

304 consequentemente, diminuir os níveis de aderência e interações leucocitárias. Tal desfecho é
305 positivo no contexto da RD, visto que, assim, há uma redução da resposta inflamatória e do
306 dano à barreira hemato-retiniana. Contudo, perante a divergência dos resultados, outros
307 trabalhos são necessários para confirmar qual o papel desse miRSNP na patogênese da RD.

308 Em relação ao miR-146a, estudos vêm demonstrando o envolvimento desse miRNA
309 na diminuição da resposta imune inata, após o reconhecimento de componentes bacterianos
310 por receptores do tipo Toll (TLR) em macrófagos e monócitos; sendo esse miRNA ativado
311 tanto por citocinas próinflamatórias (TNF e IL-1 β) como por lipopolissacarídeos (LPS)
312 (NAHID et al., 2009; ROGGLI et al., 2010; NAHID et al., 2011; RUSCA; MONTICELLI,
313 2011; MEISGEN et al., 2014; DOXAKI et al., 2015). O miR-146a também participa do
314 sistema imune adaptativo, sendo altamente expresso em células T reguladoras, suprimindo a
315 resposta Th1 dependente de interferon gama (IFN- γ) (LU et al., 2010). Além disso, já foi
316 demonstrado que o miR-146a regula negativamente a expressão do NF- κ B, o qual regula
317 múltiplas vias de sinalização envolvidas na indução da inflamação, resposta imune e
318 apoptose; tendo um papel importante no desenvolvimento da RD, visto que estas vias são
319 ativadas pela hiperglicemia, que está presente no contexto da RD; e sugerindo, então, que o
320 miR-146a pode ser um potencial alvo terapêutico para o tratamento de RD (TAGANOV et
321 al., 2006; BALTIMORE et al., 2008; KOVACS et al., 2011; KAIDONIS et al., 2016). O miR-
322 146a está envolvido também na regulação negativa da produção de fibronectina, uma proteína
323 da matriz extracelular que se deposita em diversos órgãos, incluindo a retina (FENG et al.,
324 2011; KAIDONIS et al., 2016).

325 Neste contexto, o alelo C do miRSNP rs2910164 (G/C) foi associado com alterações
326 na estrutura do *pre-miR-146a*, reduzindo o processamento eficaz do miR-146a maduro, e
327 diminuindo, assim, a expressão e a interação dele com seus mRNAs alvos (JAZDZEWSKI et
328 al., 2008; MISHRA; BERTINO, 2009; LIU et al., 2012; KAIDONIS et al., 2016; ASSMANN

329 et al., 2017). Dessa maneira, dada a função desse miRNA na regulação da inflamação e
330 apoptose mediadas por NF- κ B, alterações na sua sequência podem ter implicações funcionais
331 na patogênese das complicações microvasculares do DM, incluindo na RD. Kaidonis et al.
332 (2016) investigaram a associação desse polimorfismo com a DRD, RDP ou edema macular
333 diabético (EMD) em paciente com DM1 ou DM2 de uma população caucasiana da Austrália.
334 Os autores encontraram uma associação do polimorfismo investigado com a RDP no grupo de
335 pacientes com DM2 no modelo de herança dominante ($p = 0,037$). Ainda, esse estudo
336 demonstrou haver uma associação desse polimorfismo com risco para DRD no grupo de
337 pacientes com DM1 e com risco para EMD nos pacientes com DM2; evidenciando o
338 envolvimento do polimorfismo rs2910167 com a patogênese das complicações
339 microvasculares do DM.

340 Estudos funcionais, como o de Kovacs et al. (2011) no qual o miR-146a foi altamente
341 expresso em células endoteliais da retina (RECs) de ratos diabéticos comparados aos
342 controles, também demonstram que esse miRNA está envolvido na patogênese da RD. No
343 entanto, Feng et al. (2011) observaram uma diminuição da expressão do miR-146a em RECs
344 e na retina de ratos diabéticos e também identificaram a fibronectina como um alvo da
345 regulação feita por esse miRNA, sugerindo que essa diminuição encontrada seja um
346 mecanismo de aumento da produção de proteínas da matriz extracelular no DM, podendo
347 colaborar com o desenvolvimento da RD (KATO et al., 2013).

348 Assim, embora o presente estudo não tenha encontrado uma associação do
349 polimorfismo estudado no miR-146a com a RD, nota-se, com bases nos outros estudos, que
350 este miRNA está envolvido em processos fisiológicos relacionados à patogênese da RD.
351 Porém, como alguns resultados ainda são conflitantes, mais pesquisas são necessárias para
352 compreender os mecanismos pelos quais o miR-146a, e polimorfismos em seu gene
353 codificante, atuam frente à RD.

354 Em conclusão, o presente estudo indica que o polimorfismo rs4636297 no gene *miR-*
355 *126* está associado com proteção para RD em pacientes brasileiros com DM1, enquanto o
356 polimorfismo rs2910164 no gene *mir-146a* não demonstrou associação com a RD nessa
357 mesma população. O resultado encontrado para o miR-126 é plausível em termos biológicos
358 considerando o envolvimento desse miRNA na modulação da integridade vascular,
359 proliferação, angiogênese e da resposta inflamatória; os quais são intervenientes na
360 patogênese da RD. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa associação
361 em outras populações e para melhor compreender o seu papel na RD.

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379 **AGRADECIMENTOS**

380

381 Este estudo foi parcialmente apoiado por verbas do Conselho Nacional de
382 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; número de concessão: 482525/2013-4),
383 Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
384 (número 18-0008), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
385 (FAPERGS; número de concessão: 1928-2551/13-2), e Coordenação de Aperfeiçoamento de
386 Pessoal de Nível Superior (CAPES). Daisy Crispim é bolsista CNPq, Eloísa Toscan
387 Massignam é bolsista FAPERGS, enquanto Cristine Dieter e Felipe Mateus Pellenz são
388 beneficiários de bolsa CAPES.

389

390 **CONFLITO DE INTERESSE**

391

392 Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

393

394 **DIVULGAÇÃO ÉTICA**

395

396 Todos os procedimentos realizados no estudo envolvendo os participantes humanos
397 estavam de acordo com os padrões éticos do comitê de pesquisa do Hospital de Clínicas de
398 Porto Alegre (Número Aprovação 18-0008) e com a Declaração de Helsinque de 1964 e suas
399 alterações ou padrões éticos comparáveis. Todos os sujeitos deram parecer de consentimento
400 favorável e por escrito antes da participação.

401

402

403

404

405 **REFERÊNCIAS**

406

407 Adamiec-Mroczek, J.; Oficjalska-Mlynczak, J. (2008) Assessment of selected adhesion
408 molecule and proinflammatory cytokine levels in the vitreous body of patients with type 2
409 diabetes--role of the inflammatory-immune process in the pathogenesis of proliferative
410 diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, v. 246, n. 12, p. 1665-70.

411

412 Aiello, L. P. et al. (1998) Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*, v. 21, n. 1, p. 143-56.

413

414 American Academy of Ophthalmology Retina/Vitreous Panel. (2017) Preferred Practice
415 Pattern® Guidelines. Diabetic Retinopathy. San Francisco, CA: American Academy of
416 Ophthalmology.

417

418 American Diabetes Association - ADA. (2018) Classification and Diagnosis of Diabetes:
419 Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, v. 41, n. Suppl 1, p. S13-S27.

420

421 Andrassy, K. M. (2013) Comments on 'KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the
422 Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease'. *Kidney Int*, v. 84, n. 3, p. 622-3.

423

424 Asgeirsdottir, S. A. et al. (2012) MicroRNA-126 contributes to renal microvascular
425 heterogeneity of VCAM-1 protein expression in acute inflammation. *Am J Physiol Renal
426 Physiol*, v. 302, n. 12, p. F1630-9.

427

428 Assmann, T. S. et al. (2014) Polymorphisms in the TLR3 gene are associated with risk for
429 type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*, v. 170, n. 4, p. 519-27.

430

431 Assmann, T. S. et al. (2017) Polymorphisms in genes encoding miR-155 and miR-146a are
432 associated with protection to type 1 diabetes mellitus. *Acta Diabetol*, v. 54, n. 5, p. 433-441.

433

434 Bai, X. et al. (2017) MicroRNA-126 Reduces Blood-Retina Barrier Breakdown via the
435 Regulation of VCAM-1 and BCL2L1 in Ischemic Retinopathy. *Ophthalmic Res*, v. 57, n. 3,
436 p. 173-185.

437

438 Baltimore, D. et al. (2008) MicroRNAs: new regulators of immune cell development and
439 function. *Nat Immunol*, v. 9, n. 8, p. 839-45.

440

441 Banerjee, N. et al. Pomegranate polyphenolics suppressed azoxymethane-induced colorectal
442 aberrant crypt foci and inflammation: possible role of miR-126/VCAM-1 and miR-
443 126/PI3K/AKT/mTOR. (2013) *Carcinogenesis*, v. 34, n. 12, p. 2814-22.

444

- 445 Barile, G. R. et al. (1999) Soluble cellular adhesion molecules in proliferative
446 vitreoretinopathy and proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res*, v. 19, n. 3, p. 219-27.
- 447
- 448 Barutta, F. et al. (2017) MicroRNA-126 and micro-/macrovascular complications of type 1
449 diabetes in the EURODIAB Prospective Complications Study. *Acta Diabetol*, v. 54, n. 2, p.
450 133-139.
- 451
- 452 Blum, A. et al. (2018) Levels of adhesion molecules in peripheral blood correlat with stages
453 of diabetic retinopathy and may serve as bio markers for microvascular complications.
454 *Cytokine*, v. 106, p. 76-79.
- 455
- 456 Bosco, A. et al. (2005) [Diabetic retinopathy]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 49, n. 2, p.
457 217-27.
- 458
- 459 Brondani, L. A. et al. (2012) The UCP1 -3826A/G polymorphism is associated with diabetic
460 retinopathy and increased UCP1 and MnSOD2 gene expression in human retina. *Invest*
461 *Ophthalmol Vis Sci*, v. 53, n. 12, p. 7449-57.
- 462
- 463 Cerutti, C. et al. (2017) MiR-126 and miR-126* regulate shear-resistant firm leukocyte
464 adhesion to human brain endothelium. *Sci Rep*, v. 7, p. 45284.
- 465
- 466 Crispim, D. et al. (2010) Polymorphisms of the UCP2 gene are associated with proliferative
467 diabetic retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Clin Endocrinol*, v. 72, n. 5, p. 612-9.
- 468
- 469 Dong, L. et al. (2017) The gene polymorphisms of IL-8(-251T/A) and IP-10(-1596C/T) are
470 associated with susceptibility and progression of type 2 diabetic retinopathy in northern
471 Chinese population. *Eye*, v. 31, n. 4, p. 601-607.
- 472
- 473 Doxaki, C. et al. (2015) Coordinated Regulation of miR-155 and miR-146a Genes during
474 Induction of Endotoxin Tolerance in Macrophages. *J Immunol*, v. 195, n. 12, p. 5750-61.
- 475
- 476 Feng, B. et al. (2011) miR-146a-Mediated extracellular matrix protein production in chronic
477 diabetes complications. *Diabetes*, v. 60, n. 11, p. 2975-84.
- 478
- 479 Fish, J. E. et al. (2008) miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev*
480 *Cell*, v. 15, n. 2, p. 272-84.
- 481
- 482 Fong, D. et al. (2004) Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care*, v. 27 Suppl 1, p. S84-7.
- 483
- 484 Gustavsson, C. et al. (2010) Vascular cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in
485 mice retinal vessels is affected by both hyperglycemia and hyperlipidemia. *PLoS One*, v. 5, n.
486 9, p. e12699.

- 487
488 Harnprasopwat, R. et al. (2010) Alteration of processing induced by a single nucleotide
489 polymorphism in pri-miR-126. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 399, n. 2, p. 117-22.
- 490
491 Harris, T. A. et al. (2008) MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell
492 adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, n. 5, p. 1516-21.
- 493
494 International Diabetes Federation - IDF. IDF diabetes atlas. 8. ed. [S. l.]: IDF, 2017. ISBN
495 978-2-930229-87-4. Disponível em:
496 <http://www.diabetesatlas.org/IDF_Diabetes_Atlas_8e_interactive_EN>. Acesso em: 20 mar.
497 2018.
- 498
499 Jazdzewski, K. et al. (2008) Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression
500 and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, n. 20, p.
501 7269-74.
- 502
503 Joglekar, M. V. et al. (2016) Circulating microRNA Biomarkers of Diabetic Retinopathy.
504 *Diabetes*, v. 65, n. 1, p. 22-4.
- 505
506 Kaidonis, G. et al. (2016) A single-nucleotide polymorphism in the MicroRNA-146a gene is
507 associated with diabetic nephropathy and sight-threatening diabetic retinopathy in Caucasian
508 patients. *Acta Diabetol*, v. 53, n. 4, p. 643-50.
- 509
510 Kantharidis, P. et al. (2011) Diabetes complications: the microRNA perspective. *Diabetes*, v.
511 60, n. 7, p. 1832-7.
- 512
513 Kato, M.; Castro, N. E.; Natarajan, R. (2013) MicroRNAs: potential mediators and
514 biomarkers of diabetic complications. *Free Radic Biol Med*, v. 64, p. 85-94..
- 515
516 Kim, E. et al. (2012) Increased expression of vascular cell adhesion molecule 1 in muscle
517 biopsy samples from juvenile dermatomyositis patients with short duration of untreated
518 disease is regulated by miR-126. *Arthritis Rheum*, v. 64, n. 11, p. 3809-17.
- 519
520 Kovacs, B. et al. (2011) MicroRNAs in early diabetic retinopathy in streptozotocin-induced
521 diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 52, n. 7, p. 4402-9.
- 522
523 Lahiri, D. K.; Nurnberger, J. I., JR. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation
524 of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, v. 19, n. 19, p. 5444.
- 525
526 Levey, A. S. et al. (2009) A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern*
527 *Med*, v. 150, n. 9, p. 604-12.
- 528

- 529 Little, J. et al. (2009) STrengthening the REporting of Genetic Association Studies
530 (STREGA)--an extension of the STROBE statement. *Genet Epidemiol*, v. 33, n. 7, p. 581-98.
- 531
- 532 Liu, C. et al. (2012) MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites,
533 identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. *BMC Genomics*, v. 13, p. 661.
- 534
- 535 Lu, L. F. et al. (2010) Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of
536 Th1 responses. *Cell*, v. 142, n. 6, p. 914-29.
- 537
- 538 Mcauley, A. K. et al. (2015) A genetic variant regulating miR-126 is associated with sight
539 threatening diabetic retinopathy. *Diab Vasc Dis Res*, v. 12, n. 2, p. 133-8.
- 540
- 541 Meisgen, F. et al. (2014) MiR-146a negatively regulates TLR2-induced inflammatory
542 responses in keratinocytes. *J Invest Dermatol*, v. 134, n. 7, p. 1931-1940.
- 543
- 544 Mishra, P. J.; Bertino, J. R. (2009) MicroRNA polymorphisms: the future of
545 pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine.
546 *Pharmacogenomics*, v. 10, n. 3, p. 399-416.
- 547
- 548 Moura, J.; Borsheim, E.; Carvalho, E. (2014) The Role of MicroRNAs in Diabetic
549 Complications-Special Emphasis on Wound Healing. *Genes*, v. 5, n. 4, p. 926-56.
- 550
- 551 Nahid, M. A. et al. (2009) miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance:
552 IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem*, v. 284, n. 50, p. 34590-9.
- 553
- 554 Nahid, M. A.; Satoh, M.; Chan, E. K. (2011) Mechanistic role of microRNA-146a in
555 endotoxin-induced differential cross-regulation of TLR signaling. *J Immunol*, v. 186, n. 3, p.
556 1723-34.
- 557
- 558 Natarajan, R.; Putta, S.; Kato, M. (2012) MicroRNAs and diabetic complications. *J*
559 *Cardiovasc Transl Res*, v. 5, n. 4, p. 413-22.
- 560
- 561 Pereira, B. L. et al. (2018) Interleukin-10 -1082A>G (rs1800896) polymorphism is associated
562 with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, v. 138, p. 187-192.
- 563
- 564 Priscakova, P.; Minarik, G.; Repiska, V. (2016) Candidate gene studies of diabetic
565 retinopathy in human. *Mol Biol Rep*, v. 43, n. 12, p. 1327-1345.
- 566
- 567 Qin, L. L. et al. (2017) MicroRNA-126: a promising novel biomarker in peripheral blood for
568 diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol*, v. 10, n. 4, p. 530-534.
- 569

- 570 Roggli, E. et al. (2010) Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by
571 proinflammatory cytokines on pancreatic beta-cells. *Diabetes*, v. 59, n. 4, p. 978-86.
- 572
- 573 Rusca, N.; Monticelli, S. (2011) MiR-146a in Immunity and Disease. *Mol Biol Int*, v. 2011, p.
574 437301.
- 575
- 576 Sharma, S. et al. (2015) Elevated Serum Levels of Soluble TNF Receptors and Adhesion
577 Molecules Are Associated with Diabetic Retinopathy in Patients with Type-1 Diabetes.
578 *Mediators Inflamm*, v. 2015, p. 279393.
- 579
- 580 Taganov, K. D. et al. (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an
581 inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S*
582 *A*, v. 103, n. 33, p. 12481-6.
- 583
- 584 Tai, H. C. et al. (2014) Osteoblast-derived WNT-induced secreted protein 1 increases VCAM-
585 1 expression and enhances prostate cancer metastasis by down-regulating miR-126.
586 *Oncotarget*, v. 5, n. 17, p. 7589-98.
- 587
- 588 Tao, D. et al. (2017) Association between the RAGE (receptor for advanced glycation end-
589 products) -374T/A gene polymorphism and diabetic retinopathy in T2DM. *Rev Assoc Med*
590 *Bras*, v. 63, n. 11, p. 971-977.
- 591
- 592 Valiatti, F. B. et al. (2011) [The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis and
593 diabetic retinopathy.]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 55, n. 2, p. 106-113.
- 594
- 595 Von Elm, E. et al. (2008) The Strengthening the Reporting of Observational Studies in
596 Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin*
597 *Epidemiol*, v. 61, n. 4, p. 344-9.
- 598
- 599 Wang, S. et al. (2008) The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular
600 integrity and angiogenesis. *Dev Cell*, v. 15, n. 2, p. 261-71.
- 601
- 602 Wang, X. et al. (2018) Dual-Targeted Theranostic Delivery of miRs Arrests Abdominal
603 Aortic Aneurysm Development. *Mol Ther*, v. 26, n. 4, p. 1056-1065.
- 604
- 605 Wilkinson, C. P. et al. (2003) Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic
606 macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*, v. 110, n. 9, p. 1677-82.
- 607
- 608 Wu, H.; Zhang, J. (2018) miR-126 in Peripheral Blood Mononuclear Cells Negatively
609 Correlates with Risk and Severity and is Associated with Inflammatory Cytokines as well as
610 Intercellular Adhesion Molecule-1 in Patients with Coronary Artery Disease. *Cardiology*, v.
611 139, n. 2, p. 110-118.

- 612
613 Xiang, Y. et al. (2017) Association of miR-21, miR-126 and miR-605 gene polymorphisms
614 with ischemic stroke risk. *Oncotarget*, v. 8, n. 56, p. 95755-95763.
- 615
616 Xie, X. J. et al. (2017) Association between the vascular endothelial growth factor single
617 nucleotide polymorphisms and diabetic retinopathy risk: A meta-analysis. *J Diabetes*, v. 9, n.
618 8, p. 738-753.
- 619
620 Xu, D. et al. (2016) Association of Complement C5 Gene Polymorphisms with Proliferative
621 Diabetic Retinopathy of Type 2 Diabetes in a Chinese Han Population. *PLoS One*, v. 11, n. 3,
622 p. e0149704.
- 623
624 Ye, P. et al. (2014) Hypoxia-induced deregulation of miR-126 and its regulative effect on
625 VEGF and MMP-9 expression. *Int J Med Sci*, v. 11, n. 1, p. 17-23.
- 626
627 Yuan, X.; Chen, J.; Dai, M. (2016) Paeonol promotes microRNA-126 expression to inhibit
628 monocyte adhesion to ox-LDL-injured vascular endothelial cells and block the activation of
629 the PI3K/Akt/NF-kappaB pathway. *Int J Mol Med*, v. 38, n. 6, p. 1871-1878.
- 630
631 Zaharieva, E. T.; Kamenov, Z. A.; Savov, A. S. (2017) TLR4 polymorphisms seem not to be
632 associated with prediabetes and type 2 diabetes but predispose to diabetic retinopathy; TLR4
633 polymorphisms in glucose continuum. *Endocr Regul*, v. 51, n. 3, p. 137-144.

Tabela 1 – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com DM1 há 10 anos ou mais e sem RD ou com RDNP leve (controles) e dos pacientes com DM1 e com RDP ou RDNP grave ou moderada (casos).

Características	Controles (n = 219)	Casos (n = 196)	P*
Idade (anos)	23,6 ± 8,9	42,1 ± 12,3	< 0,001
Tempo de DM1 (anos)	18,8 ± 8,1	23,6 ± 8,9	< 0,001
Gênero (% homens)	50,2	49,5	0,959
Etnia (% negros)	10,0	10,3	> 0,999
IMC (kg/m ²)	24,5 ± 3,6	24,1 ± 4,5	0,442
HbA1c (%)	8,5 ± 1,8	9,2 ± 2,2	0,001
Hipertensão (%)	32,3	50,3	0,001
Pressão arterial sistólica (mmHg)	119,4 ± 15,1	127,6 ± 22,5	< 0,001
Pressão arterial diastólica (mmHg)	75,7 ± 10,1	80,6 ± 12,9	< 0,001
Triglicerídeos (mg/dL)	68,0 (52,0 – 100,0)	97,0 (68,0 – 157,0)	< 0,001
Colesterol Total (mg/dL)	174,8 ± 41,6	192,1 ± 53,1	< 0,001
HDL (mg/dL)	56,5 ± 17,5	57,7 ± 18,4	0,520
Doença renal do diabetes (%)	16,7	44,3	< 0,001
Creatinina sérica (µg/dL)	0,9 (0,8 – 1,0)	1,0 (0,8 – 1,6)	< 0,001
TFGe (mL/min/1,73m ²)	104,0 (89,0 – 120,0)	91,0 (61,2 – 115,5)	0,001

Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: Os dados são mostrados pela média do grupo e seu desvio padrão, mediana (valores do percentil 25 – 75) ou porcentagem (%) para todas as características. HbA1c: hemoglobina glicada; IMC: índice de massa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidade; TFGGe: taxa de filtração glomerular estimada. P* foi calculado pelo teste χ^2 , teste *t* de Student ou teste Mann-Whitney U, conforme adequado.

Tabela 2 – Frequências genótípicas e alélicas, e nos diferentes modelos de herança genética, do polimorfismo rs4636297 no gene *miR-126* e do polimorfismo rs2910164 no gene *miR-146a* em pacientes com DM1 há 10 anos ou mais e sem RD ou com RDNP leve (controles) e em pacientes com DM1 e com RDP ou RDNP grave ou moderada (casos).

	Grupo controle (n = 206)	Grupo caso (n = 186)	RC (IC 95%) / P*	RC (IC 95%) / P† ajustado
rs4636297 – miR-126				
<i>Genótipo</i>				
G/G	60 (29,1)	72 (38,7)	1	1
G/A	104 (50,5)	79 (42,5)	0,633 (0,403 – 0,993) / 0,047	0,368 (0,162 – 0,832) / 0,016
A/A	42 (20,4)	35 (18,8)	0,694 (0,395 – 1,221) / 0,205	0,148 (0,044 – 0,504) / 0,002
<i>Alelo</i>				
G	0,54	0,60	0,101	
A	0,46	0,40		
<i>Modelo recessivo</i>				
G/G + G/A	164 (79,6)	151 (81,2)	1	1
A/A	42 (20,4)	35 (18,8)	0,905 (0,549 – 1,492) / 0,696	0,279 (0,093 – 0,838) / 0,023
<i>Modelo aditivo</i>				
G/G	60 (58,8)	72 (67,3)	1	1
A/A	42 (41,2)	35 (32,7)	0,694 (0,395 – 1,221) / 0,205	0,080 (0,018 – 0,362) / 0,001
<i>Modelo dominante</i>				
G/G	60 (29,1)	72 (38,7)	1	1
G/A + A/A	146 (70,9)	114 (61,3)	0,651 (0,427 – 0,991) / 0,046	0,300 (0,137 – 0,658) / 0,003

	Grupo controle (n = 219)	Grupo caso (n = 196)	RC (IC 95%) / P*	RC (IC 95%) / P† ajustado
rs2910164 – miR-146a				
Genótipo				
G/G	117 (53,5)	110 (56,1)	1	1
G/C	87 (39,7)	66 (33,7)	1,418 (0,691 – 2,909) / 0,340	2,428 (0,623 – 9,467) / 0,201
C/C	15 (6,8)	20 (10,2)	0,807 (0,534 – 1,219) / 0,308	0,731 (0,346 – 1,544) / 0,412
Alelo				
G	0,73	0,73	0,977	
C	0,27	0,27		
Modelo recessivo				
G/G + G/C	204 (93,2)	176 (89,8)	1	1
C/C	15 (6,8)	20 (10,2)	1,545 (0,768 – 3,110) / 0,222	2,766 (0,733 – 10,434) / 0,133
Modelo aditivo				
G/G	117 (88,6)	110 (84,6)	1	1
C/C	15 (11,4)	20 (15,4)	1,418 (0,691 – 2,909) / 0,340	2,278 (0,573 – 9,050) / 0,242
Modelo dominante				
G/G	117 (53,4)	110 (56,1)	1	1
G/C + C/C	102 (46,6)	86 (43,9)	0,897 (0,609 – 1,321) / 0,582	0,894 (0,443 – 1,802) / 0,754

Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: Os dados são apresentados como número (%) ou proporção. P* foi calculado pelo teste χ^2 . P† é o valor obtido após análises de regressão logística ajustada para correção para presença de hipertensão, colesterol, hemoglobina glicada e presença de doença renal do diabetes.

Tabela 3 – Características clínicas e laboratoriais em pacientes com DM1 e RDP ou RDNP grave ou moderada (casos) no modelo aditivo do polimorfismo rs4636297 no gene *miR-126*.

Características	G/G (n = 72)	A/A (n = 35)	P*
Idade (anos)	41,5 ± 13,5	43,9 ± 12,6	0,412
Tempo de DM (anos)	23,3 ± 9,9	24,8 ± 9,0	0,537
Gênero (% homens)	50,0	48,6	> 0,999
Etnia (% negros)	9,7	14,3	0,707
HbA1c (%)	9,1 ± 2,3	9,0 ± 2,6	0,899
Hipertensão (% sim)	39,0	57,1	0,174
Pressão arterial sistólica (mmHg)	123,2 ± 24,9	129,1 ± 17,1	0,255
Pressão arterial diastólica (mmHg)	79,8 ± 12,5	80,5 ± 11,0	0,803
IMC (kg/m ²)	24,0 ± 3,4	24,6 ± 4,9	0,526
Triglicerídeos (mg/dL)	94,0 (72,0 – 136,5)	102,5 (71,0 – 126,0)	0,921
Creatinina sérica (µg/dL)	1,0 (0,8 – 1,4)	1,0 (0,9 – 2,2)	0,350
Colesterol total (mg/dL)	187,7 ± 59,9	189,0 ± 45,3	0,913
HDL (mg/dL)	58,2 ± 19,1	61,9 ± 18,6	0,375
Doença renal do diabetes (%)	50,0	20,0	0,442
TFGe (mL/min/1,73m ²)	101,0 (80,0 – 120,7)	91,0 (61,2 – 115,5)	0,431

Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: Os dados são mostrados pela média do grupo e seu desvio padrão, mediana (valores do percentil 25 – 75) ou porcentagem (%) para todas as características. HbA1c: hemoglobina glicada; IMC: índice de massa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidade; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada. P* foi calculado pelo teste χ^2 , teste *t* de Student ou teste Mann-Whitney U, conforme adequado.

Tabela 4 – Características clínicas e laboratoriais em pacientes com DM1 e RDP ou RDNP grave ou moderada (casos) no modelo aditivo do polimorfismo rs2910164 no gene *miR-146a*.

Características	G/G (n = 110)	C/C (n = 20)	P*
Idade (anos)	42,5 ± 11,3	40,6 ± 10,5	0,475
Tempo de DM (anos)	23,9 ± 9,0	27,4 ± 6,5	0,188
Gênero (% homens)	55,5	35,0	0,149
Etnia (% negros)	9,1	5,0	0,867
HbA1c (%)	8,9 ± 2,0	9,3 ± 2,0	0,515
Hipertensão (% sim)	47,7	50,0	> 0,999
Pressão arterial sistólica (mmHg)	128,8 ± 24,7	126,2 ± 21,4	0,686
Pressão arterial diastólica (mmHg)	81,1 ± 13,9	79,6 ± 11,8	0,676
IMC (kg/m ²)	24,3 ± 4,3	26,5 ± 4,8	0,155
Triglicerídeos (mg/dL)	98,0 (63,0 – 165,5)	113,0 (68,0 – 156,0)	0,997
Creatinina sérica (µg/dL)	1,0 (0,8 – 2,0)	1,0 (0,7 – 1,3)	0,302
Colesterol total (mg/dL)	186,6 ± 41,0	212,8 ± 63,7	0,023
HDL (mg/dL)	58,0 ± 19,7	61,3 ± 20,1	0,504
Doença renal do diabetes (%)	45,0	42,9	> 0,999
TFGe (mL/min/1,73m ²)	103,0 (80,0 – 121,7)	98,0 (90,0 – 128,0)	0,678

Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: Os dados são mostrados pela média do grupo e seu desvio padrão, mediana (valores do percentil 25 – 75) ou porcentagem (%) para todas as características. HbA1c: hemoglobina glicada; IMC: índice de massa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidade; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada. P* foi calculado pelo teste χ^2 , teste *t* de Student ou teste Mann-Whitney U, conforme adequado.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Em relação ao polimorfismo rs4636297 (G/A), o presente estudo demonstrou uma associação do alelo A com proteção para RD em pacientes com DM1 de uma população brasileira do sul do Brasil, nos três modelos de herança genética analisados: recessivo (A/A vs. G/G + G/A), aditivo (A/A vs. G/G) e dominante (G/A + A/A vs. G/G) ($p = 0,023$; $p = 0,001$ e $p = 0,003$; respectivamente). Já em relação ao polimorfismo rs2910164 (G/C), não se encontrou nenhuma associação com RD nessa mesma população. As frequências genótípicas e alélicas não diferiram entre casos e controles ($p = 0,412$ e $p = 0,977$; respectivamente); e o mesmo foi encontrado nas análises de modelo de herança.

Desta forma, o presente estudo foi o primeiro a relatar a associação do polimorfismo rs4636297 no gene *miR-126* e proteção para o RD em um estudo de caso-controle em pacientes com DM1 de uma população brasileira. Diferentemente, o estudo também demonstrou que o polimorfismo rs2910164 no gene *miR-146a* parece não estar associado à RD nesta mesma população do sul do Brasil.

Como perspectivas desse trabalho, com base nos resultados alcançados, pretende-se aumentar o tamanho amostral, genotipando também paciente com diabetes mellitus tipo 2, para que se tenha mais poder estatístico nas análises. E, além disso, será realizada uma revisão sistemática sobre os dois microRNAs estudados e seu envolvimento na RD, tanto em relação a polimorfismos genéticos como também na sua atuação em genes importante relacionados a esta patologia.

REFERÊNCIAS

AIELLO, L. P. et al. Diabetic retinopathy. **Diabetes Care**, v. 21, n. 1, p. 143-56, Jan 1998. ISSN 0149-5992 (Print) 0149-5992 (Linking).

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. **Diabetes Care**, v. 41, n. Suppl 1, p. S13-S27, Jan 2018. ISSN 1935-5548 (Electronic) 0149-5992 (Linking).

ASSMANN, T. S. et al. Polymorphisms in genes encoding miR-155 and miR-146a are associated with protection to type 1 diabetes mellitus. **Acta Diabetologica**, v. 54, n. 5, p. 433-441, Jan 19 2017. ISSN 1432-5233 (Electronic) 0940-5429 (Linking).

ASSMANN, T. S. et al. MicroRNA expression profiles and type 1 diabetes mellitus: systematic review and bioinformatic analysis. **Endocrine Connections**, v. 6, n. 8, p. 773-790, Nov 2017. ISSN 2049-3614 (Print) 2049-3614 (Linking).

BAI, Y. et al. MicroRNA-126 inhibits ischemia-induced retinal neovascularization via regulating angiogenic growth factors. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 91, n. 1, p. 471-7, Aug 2011. ISSN 1096-0945 (Electronic) 0014-4800 (Linking).

BARUTTA, F. et al. MicroRNA-126 and micro-/macrovascular complications of type 1 diabetes in the EURODIAB Prospective Complications Study. **Acta Diabetologica**, v. 54, n. 2, p. 133-139, Feb 2017. ISSN 1432-5233 (Electronic) 0940-5429 (Linking).

BOELTER, M. C. et al. Fatores de risco para retinopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 239-247, 2003. ISSN 0004-2749 (Print version) 1678-2925 (On-line version).

BOUCAS, A. P. et al. The role of interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1) in the development of type 1 diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 57, n. 9, p. 667-76, Dec 2013. ISSN 1677-9487 (Electronic) 0004-2730 (Linking).

BUTZ, H. et al. Circulating miRNAs as biomarkers for endocrine disorders. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 39, n. 1, p. 1-10, Jan 2016. ISSN 1720-8386 (Electronic) 0391-4097 (Linking).

CAMMAERTS, S. et al. Genetic variants in microRNA genes: impact on microRNA expression, function, and disease. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 186, 2015. ISSN 1664-8021 (Electronic) 1664-8021 (Linking).

CARPENA, M. et al. Genetics of diabetic nephropathy. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 3, p. 253-61, Mar 2010. ISSN 1677-9487.

CORREA-GIANNELLA, M. L.; VIEIRA, S. M. [Genetic susceptibility to microangiopathy development in Type 1 diabetes mellitus]. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 375-86, Mar 2008. ISSN 1677-9487 (Electronic) 0004-2730 (Linking).

DRUMMOND, K. R. G. et al. Regional differences in the prevalence of diabetic retinopathy: a multi center study in Brazil. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 10, p. 17, 2018. ISSN 1758-5996 (Print) 1758-5996 (Linking).

EIZIRIK, D. L.; COLLI, M. L.; ORTIS, F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 4, p. 219-26, Apr 2009. ISSN 1759-5037 (Electronic) 1759-5029 (Linking).

ESTEVEZ, J. F. et al. Prevalence of diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes mellitus. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 3, p. 268-73, May-Jun 2009. ISSN 0104-4230 (Print) 0104-4230 (Linking).

FENG, B. et al. miR-146a-Mediated extracellular matrix protein production in chronic diabetes complications. **Diabetes**, v. 60, n. 11, p. 2975-84, Nov 2011. ISSN 1939-327X (Electronic) 0012-1797 (Linking).

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 2, p. 102-14, Feb 2008. ISSN 1471-0064 (Electronic) 1471-0056 (Linking).

FISH, J. E. et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. **Developmental Cell**, v. 15, n. 2, p. 272-84, Aug 2008. ISSN 1878-1551 (Electronic) 1534-5807 (Linking).

FONG, D. et al. Retinopathy in diabetes. **Diabetes Care**, v. 27 Suppl 1, p. S84-7, Jan 2004. ISSN 0149-5992.

GOMAA, A. R.; ELSAYED, E. T.; MOFTAH, R. F. MicroRNA-200b Expression in the Vitreous Humor of Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy. **Ophthalmic Research**, v. 58, n. 3, p. 168-175, 2017. ISSN 1423-0259 (Electronic) 0030-3747 (Linking).

HAMPTON, B. M. et al. Update on genetics and diabetic retinopathy. **Clinical Ophthalmology**, v. 9, p. 2175-93, 2015. ISSN 1177-5467 (Print) 1177-5467 (Linking).

HARNPRASOPWAT, R. et al. Alteration of processing induced by a single nucleotide polymorphism in pri-miR-126. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, n. 2, p. 117-22, Aug 20 2010. ISSN 1090-2104 (Electronic) 0006-291X (Linking).

HIROTA, K. et al. Comparisons of microRNA expression profiles in vitreous humor between eyes with macular hole and eyes with proliferative diabetic retinopathy. **Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 253, n. 3, p. 335-42, Mar 2015. ISSN 1435-702X (Electronic) 0721-832X (Linking).

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION - IDF. **IDF diabetes atlas**. 8. ed. [S. l.]: IDF, 2017. ISBN 978-2-930229-87-4. Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org/IDF_Diabetes_Atlas_8e_interactive_EN>. Acesso em: 20 mar. 2018.

JAZDZEWSKI, K. et al. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 20, p. 7269-74, May 20 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking).

JOGLEKAR, M. V. et al. Circulating microRNA Biomarkers of Diabetic Retinopathy. **Diabetes**, v. 65, n. 1, p. 22-4, Jan 2016. ISSN 1939-327X (Electronic) 0012-1797 (Linking).

JONG, V. M. et al. Post-transcriptional control of candidate risk genes for type 1 diabetes by rare genetic variants. **Genes & Immunity**, v. 14, n. 1, p. 58-61, Jan 2013. ISSN 1476-5470 (Electronic) 1466-4879 (Linking).

KAIDONIS, G. et al. A single-nucleotide polymorphism in the MicroRNA-146a gene is associated with diabetic nephropathy and sight-threatening diabetic retinopathy in Caucasian patients. **Acta Diabetologica**, v. 53, n. 4, p. 643-50, Aug 2016. ISSN 1432-5233 (Electronic) 0940-5429 (Linking).

KANTHARIDIS, P. et al. Diabetes complications: the microRNA perspective. **Diabetes**, v. 60, n. 7, p. 1832-7, Jul 2011. ISSN 1939-327X (Electronic) 0012-1797 (Linking).

KATO, M.; CASTRO, N. E.; NATARAJAN, R. MicroRNAs: potential mediators and biomarkers of diabetic complications. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 64, p. 85-94, Sep 2013. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking).

KOVACS, B. et al. MicroRNAs in early diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 7, p. 4402-9, Jun 21 2011. ISSN 1552-5783 (Electronic) 0146-0404 (Linking)..

KROLICZEWSKI, J. et al. microRNA single polynucleotide polymorphism influences on microRNA biogenesis and mRNA target specificity. **Gene**, v. 640, p. 66-72, Jan 15 2018. ISSN 1879-0038 (Electronic) 0378-1119 (Linking).

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-54, Dec 3 1993. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking).

LI, E. H. et al. Effects of miRNA-200b on the development of diabetic retinopathy by targeting VEGFA gene. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 2, Apr 30 2017. ISSN 1573-4935 (Electronic) 0144-8463 (Linking).

LIU, C. et al. MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. **BMC Genomics**, v. 13, p. 661, 2012. ISSN 1471-2164 (Electronic) 1471-2164 (Linking).

MA, J. et al. Comparisons of serum miRNA expression profiles in patients with diabetic retinopathy and type 2 diabetes mellitus. **Clinics**, v. 72, n. 2, p. 111-115, Feb 1 2017. ISSN 1980-5322 (Electronic) 1807-5932 (Linking).

MCAULEY, A. K. et al. A genetic variant regulating miR-126 is associated with sight threatening diabetic retinopathy. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 12, n. 2, p. 133-8, Mar 2015. ISSN 1752-8984 (Electronic) 1479-1641 (Linking).

NATARAJAN, R.; PUTTA, S.; KATO, M. MicroRNAs and diabetic complications. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 5, n. 4, p. 413-22, Aug 2012. ISSN 1937-5395 (Electronic) 1937-5387 (Linking).

PASCHOU, S. A. et al. On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. **Endocrine Connections**, v. 7, n. 1, p. R38-R46, Jan 2018. ISSN 2049-3614 (Print) 2049-3614 (Linking).

PETROVIC, D. Candidate genes for proliferative diabetic retinopathy. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 540416, 2013. ISSN 2314-6141 (Electronic).

PIROT, P.; CARDOZO, A. K.; EIZIRIK, D. L. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 156-65, Mar 2008. ISSN 1677-9487 (Electronic) 0004-2730 (Linking).

PRISCAKOVA, P.; MINARIK, G.; REPISKA, V. Candidate gene studies of diabetic retinopathy in human. **Molecular Biology Reports**, v. 43, n. 12, p. 1327-1345, Dec 2016. ISSN 1573-4978 (Electronic) 0301-4851 (Linking).

QIN, L. L. et al. MicroRNA-126: a promising novel biomarker in peripheral blood for diabetic retinopathy. **International Journal of Ophthalmology**, v. 10, n. 4, p. 530-534, 2017. ISSN 2222-3959 (Print) 2222-3959 (Linking).

QING, S. et al. Serum miRNA biomarkers serve as a fingerprint for proliferative diabetic retinopathy. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1733-40, 2014. ISSN 1421-9778 (Electronic) 1015-8987 (Linking).

SCHEFFEL, R. S. et al. [Prevalence of micro and macroangiopathic chronic complications and their risk factors in the care of out patients with type 2 diabetes mellitus]. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 3, p. 263-7, Jul-Sep 2004. ISSN 0104-4230 (Print) 0104-4230 (Linking).

VALIATTI, F. B. et al. [The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis and diabetic retinopathy.]. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, n. 2, p. 106-113, Mar 2011. ISSN 1677-9487 (Electronic) 0004-2730 (Linking).

WANG, S. et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. **Developmental Cell**, v. 15, n. 2, p. 261-71, Aug 2008. ISSN 1878-1551 (Electronic) 1534-5807 (Linking).

WARPEHA, K. M.; CHAKRAVARTHY, U. Molecular genetics of microvascular disease in diabetic retinopathy. **Eye**, v. 17, n. 3, p. 305-11, Apr 2003. ISSN 0950-222X.

WILKINSON, C. P. et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. **Ophthalmology**, v. 110, n. 9, p. 1677-82, Sep 2003. ISSN 0161-6420 (Print) 0161-6420 (Linking).

YE, E. A.; STEINLE, J. J. miR-146a Attenuates Inflammatory Pathways Mediated by TLR4/NF-kappaB and TNFalpha to Protect Primary Human Retinal Microvascular Endothelial Cells Grown in High Glucose. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 3958453, 2016. ISSN 1466-1861 (Electronic) 0962-9351 (Linking).


YE, E. A.; STEINLE, J. J. miR-146a suppresses STAT3/VEGF pathways and reduces apoptosis through IL-6 signaling in primary human retinal microvascular endothelial cells in high glucose conditions. **Vision Research**, v. 139, p. 15-22, Oct 2017. ISSN 1878-5646 (Electronic) 0042-6989 (Linking).

YE, P. et al. Hypoxia-induced deregulation of miR-126 and its regulative effect on VEGF and MMP-9 expression. **Internationsl Journal of Medical Science**, v. 11, n. 1, p. 17-23, 2014. ISSN 1449-1907 (Electronic) 1449-1907 (Linking).

ZAMPETAKI, A. et al. Angiogenic microRNAs Linked to Incidence and Progression of Diabetic Retinopathy in Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 65, n. 1, p. 216-27, Jan 2016. ISSN 1939-327X (Electronic) 0012-1797 (Linking).

ZHUANG, P.; MURALEEDHARAN, C. K.; XU, S. Intraocular Delivery of miR-146 Inhibits Diabetes-Induced Retinal Functional Defects in Diabetic Rat Model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 58, n. 3, p. 1646-1655, Mar 1 2017. ISSN 1552-5783 (Electronic) 0146-0404 (Linking).

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP DO HCPA DO PROJETO FIPE
02-359

 **HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 02-359 **Versão do Projeto:** 29/11/2002 **Versão do TCLE:** 29/11/2002

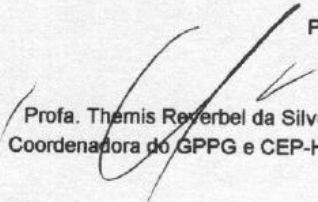
Pesquisadores:
JORGE LUIZ GROSS
ISRAEL ROISENBERG
LUIS HENRIQUE SANTOS CANANI

Título: PROJETO INTEGRADO DE PESQUISA: GENÉTICA DO DIABETES MELLITUS E DE SUAS COMPLICAÇÕES CRÔNICAS

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Por pertencer a uma área temática especial este projeto somente poderá ser iniciado após a sua aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Porto Alegre, 09 de dezembro de 2002.


Profa. Themis Reyerbel da Silveira
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

**ANEXO B – TCLE JÁ APLICADO AOS PACIENTES DO BIORREPOSITÓRIO DE
DM1 DO PROJETO FIPE 02-359**

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu,.....declaro, sob a responsabilidade do médico que assina esse documento, que concordo em participar do projeto de pesquisa **Genética do Diabetes Mellitus e suas Complicações Crônicas**. Recebi explicação clara e detalhada sobre a pesquisa acima mencionada, a qual me submeto de livre e espontânea vontade, reconhecendo que:

1) Foi explicado que o objetivo do estudo é possibilitar uma melhor compreensão dos fatores genéticos relacionados ao desenvolvimento do diabetes mellitus e suas complicações. Esse é um estudo que avaliará alterações no DNA em genes possivelmente envolvidos na patogênese do diabetes mellitus e nas complicações do diabetes.

2) Minha participação envolve a retirada de 14 ml de sangue periférico para análise, uma coleta de células da mucosa oral e uma entrevista. O desconforto que poderei sentir é o da picada da agulha e a formação de um pequeno hematoma. A coleta das células da mucosa oral será feita através de uma espátula, não causando nenhum tipo de risco ou de desconforto. A amostra de sangue coletada será utilizada estritamente para os exames laboratoriais descritos no presente projeto. O DNA genômico extraído da minha amostra de sangue e das células da mucosa oral será armazenado apropriadamente e identificado por um código, garantindo o sigilo da minha identidade. O DNA extraído será utilizado para o estudo das alterações genéticas descritas no presente projeto. O mesmo será armazenado e o estudo de outros genes no futuro somente será possível se aprovado por uma comissão de ética em pesquisa. Foi garantido que nenhuma outra pessoa, além dos pesquisadores e de seus colaboradores diretamente envolvidos no projeto, terão acesso ao material proveniente da minha amostra. Foi explicado que todos os restos celulares resultantes da coleta de sangue, não utilizados no presente trabalho, serão desprezados.

3) Me foi dada a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à minha pessoa.

4) Foi dada a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou dúvida acerca dos benefícios e riscos da pesquisa. Os dados referentes a este estudo poderão ser acessados por mim, pelos pesquisadores envolvidos ou pelo médico responsável.

5) Foi dada a garantia de não ser identificado e de ser mantido o caráter confidencial da informação em relação à minha privacidade.

6) Foi explicado que não receberei medicação e foi garantido que não terei gastos em participar desse estudo.

.....
Assinatura do paciente

Data: ____ / ____ / ____

.....
Assinatura do médico responsável

.....
Assinatura de testemunha

Declaro que esse formulário foi lido para o
paciente.....em...../...../....., pela
Dra.....enquanto
eu.....estava presente.

.....
Assinatura da testemunha

**ANEXO C – PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP DO HCPA DO PROJETO
18-0008**



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 180008

Data da Versão do Projeto: 15/02/2018

Pesquisadores:

DAISY CRISPIM MOREIRA

CRISTINE DIETER

ELOISA TOSCAN MASSIGNAM

TAIS SILVEIRA ASSMANN

Título: Estudo da associação entre polimorfismos nos genes codificadores do microRNA-126 e do microRNA-146a e a retinopatia diabética em pacientes com diabetes mellitus tipo 1

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 07 de março de 2018.

Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA

ANEXO D – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

SUBMISSION OF PAPERS

There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage: <http://www.gmb.org.br>.

1. Manuscripts must be submitted through our online submission platform hosted at: <https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>

The cover letter should be addressed to: Carlos C. F. Menck, Editor-in-Chief, Genetics and Molecular Biology

2. For submission the following instructions must be observed:

a) The manuscript must be submitted by the Corresponding Author, identified as such in the title page of the manuscript. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for any payment that may incur during the editorial process. The submitting author must provide an ORCID ID (Open Researcher and Contributor ID, <http://orcid.org/>) at the time of submission by entering it in the user profile in the submission system.

b) Entering the following metadata is required: (i) the manuscript title, (ii) a short running title (max. 35 characters), (iii) the Abstract, and (iv) up to five keywords. All these items must be exactly the same as those figuring in the first two pages of the manuscript file.

c) Statements are required informing that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. Furthermore, possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must also be disclosed. For statements on ethical issues in research see below (3.1.m).

d) The names of all co-authors, including institutional affiliations and e-mail addresses must be entered, as contact information for the Editorial Office. We strongly encourage co-authors to also provide their ORCID iDs at the time of submission.

e) In the referee suggestions field, up to five reviewer names can be entered by the author(s); valid e-mail contact addresses for these are required, in case they are selected by the editor. These suggestions can be made separately as preferred and opposed reviewer(s).

f) Files must be uploaded separately and identified according to file types, respecting the following sequence: main text document (title page as page 1), tables, figures and, if applicable, supplementary material. The main text file must include the title page, Abstract, References and, if applicable, figure legends, which must be typed on a separate page following the References and Internet Resources sections. Each table, figure and element containing supplementary material must be saved and uploaded in a separate file. Formats for text and tables are Word or RTF in Windows platform. Figures should be in TIFF or JPEG formats (see detailed instructions in 3.1.i).

g) Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

Special attention should be given to the structuring of the manuscript and correct language usage. These are important factors in the smooth running of the editorial and peer-review process, and can result in faster publication.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page. The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of up to 35 characters (including spaces); up to five key words; the corresponding author's name, full postal, and email address.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use et al. List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (et al. should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Binomial Names: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately following the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Statistical analyses should be presented as complete as possible, i.e. not only P-values should be shown, but also all other test variables required for full appreciation of the results by the reviewers and readers.

Comments on relevance of results are appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) **The References Section:** References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by et al. Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>).

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. “Personal communication” refers to information obtained from individuals other than the authors of the manuscript being submitted; “unpublished data” refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript under consideration. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilopthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample electronic article citation:

Gotzek D, Ross KG (2009) Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants. PLoS One 4:e7713.

f) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, as well as software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

Sample Internet resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), (September 4, 2009)

LEM Software, (September 4, 2009)

g) **Tables:** must be in Word format prepared with the table tool (do not use space bar or tabulator). A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript letters. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

h) **Figures** must be numbered consecutively using Arabic numerals. Images should be in TIFF or JPEG format. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. These resolutions refer to the output size of the file, that is the size in which it will appear printed in the journal; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted. Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure.

Figure legends must be included at the end of the main text file and should be typed on a new page.

i) **Nomenclature:** Taxonomic names should be in accordance with current international standards. For rules concerning gene names and gene symbols, please see separate Instruction form.

j) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will inadvertently delay publication.

k) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) **Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a statement in the text that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must be uploaded during manuscript submission.

m) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. At publication, this material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement:

Supplementary material - the following online material is available for this article:

Table S1 – < short title >

Figure S1 – < short title >

This material is available as part of the online article from

3.2 Short Communications

Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles.

They should not be considered preliminary communications

- should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited;
- should include an Abstract;
- but no further subdivision, with introduction, material and methods, results and discussion; all in a single section and without headers.
- up to four items (tables and/or figures) may be submitted;

Note: The title page, abstract and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see instructions in item 3.1.m.

3.3 Genome Insight For GMB

A new section of articles devoted to genome data (Genome Insight) will be considered for publication in Genetics and Molecular Biology. Genome Insight is for focused papers, usually of approximately 1500 words (up to four tables or figures), that publish new genome data as they become submitted to GenBank. This section is the premier forum to deliver that information directly to the genome community in a rapid and efficient publication of the genome. Data must be related to a complete (or nearly complete) and fully annotated genome for prokaryote or viruses, but a draft may be accepted for an eukaryote genome. While the focus of Genome Insight is necessarily involved in novel sequences, the manuscript must contain specifically novel biological, evolutive, biotechnological and/or metabolic insights revealed by data. The work may provide comparative analyses of previously published genomes that contain a substantial and novel insight of broadest biological and genetic significance. Submitted manuscript must contain an abstract, which should be a brief report on the organism as well as its relevance and the main insight revealed by the genome. The text (approximately 1500 words- excluding abstract, references and acknowledgements) should not contain subdivisions, but must contain the rationale for the selection of such organism as well as organism information (including taxonomy, natural habitat, phylogenetic position, eventual pathogenicity, symbiotic, biotechnological use, etc), methodology (genome sequencing and assembly; reference number at GenBank), genome relevance (which should indicate the main insights revealed by the data analysis and main conclusions. Acknowledgements and References (up to 20 references) headings should be included. Figure Legends should be provided at the end of the manuscript. Metagenome, transcriptome as well as epigenome data may also be considered for publication, but prior submission of the abstract to the Editor is necessary. Note: The title page, abstract and reference section format is that of

a full-length Research Article. For Supplementary Material see item 3.1.m. in our Instructions to Authors.

3.4 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.5 Review Articles

Review Articles are welcome. The Editor must be contacted prior to submission. Please, provide an Abstract and a list of your recent publications in the area.

3.6 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.7 History, Story and Memories

These are accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Articles accepted for publication

Once an article is accepted, the Editorial Office will send it to copy editor for language and technical corrections. If major corrections were proposed, the manuscript with the highlighted corrections will be returned to the corresponding author for approval. The final version approved by the authors must be free of any text/correction markings when returned to the Editorial Office.

After typesetting, page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from typesetting errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

Together with the proofs, a form of consent to publish and transfer of copyright is sent to the corresponding author. The latter will have to sign this form, also on behalf of any co-authors, and send it by fax to the Editorial Office.

5. Reprints

Reprints are free of charge and will be provided as a pdf-file.