



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE microRNAs CIRCULANTES NA NEFROPATIA DO
DIABETES MELLITUS TIPO 1

ANDREY HENRIQUE GAMA PINHEIRO

BELÉM-PA

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE microRNAs CIRCULANTES NA NEFROPATIA DO
DIABETES MELLITUS TIPO 1

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM/UFPA), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.
Orientadora: Profa. Dra. Giovanna Chaves Cavalcante.

BELÉM-PA

2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

P654a Pinheiro, Andrey Henrique Gama.
ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE microRNAs
CIRCULANTES NA NEFROPATIA DO DIABETES MELLITUS
TIPO 1 / Andrey Henrique Gama Pinheiro. — 2024.
50 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Giovanna Chaves Cavalcante
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular, Belém, 2024.

1. doença renal diabética. 2. nefropatia diabética. 3.
diabetes mellitus tipo 1. 4. miRNAs. 5. hsa-miR-100-5p. I.
Título.

CDD 599.935

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS

Instituições Participantes

- I. Universidade Federal do Pará (UFPA):
 - Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB);
 - Centro de Pesquisa Clínica em Endocrinologia e Diabetes do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB).

Fontes Financiadoras

- II. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- III. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	6
1.1.	EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES	7
1.2.	COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS E A NEFROPATIA	9
1.3.	FATORES GENÉTICOS DO DIABETES TIPO 1	11
1.4.	FATORES EPIGENÉTICOS DO DIABETES TIPO 1	14
1.5.	RNAs NÃO CODIFICANTES E OS miRNAs.....	15
1.5.1.	miRNAs COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES	18
2.	JUSTIFICATIVA.....	20
3.	OBJETIVOS.....	21
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	21
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4.	CAPÍTULO 1	22
5.	DISCUSSÃO GERAL.....	34
6.	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
	ANEXOS.....	45

RESUMO

O Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1) pode gerar complicações graves, como a Doença Renal Diabética (DRD) ou Nefropatia Diabética (ND), sendo esta a principal causa de doença renal terminal em todo o mundo. Na avaliação clínica da DRD em pacientes com DM1, são utilizados marcadores como a Taxa de Filtração Glomerular (TFG) e a Excreção Urinária de Albumina (EUA). No entanto, o diagnóstico precoce da DRD ainda é um desafio. Por esse motivo, a investigação de marcadores moleculares, como os microRNAs (miRNAs), oferece uma perspectiva promissora para o diagnóstico precoce, destacando-se pela sua estabilidade e capacidade de refletir manifestações moleculares iniciais. Neste estudo, investigamos quatro miRNAs (hsa-let-7i-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-501-3p e hsa-miR-100-5p) relacionados à nefropatia em pacientes com DM1, considerando a albuminúria (micro e macro) como padrão para avaliar os grupos. Adicionalmente, foi analisado o efeito da vitamina D nos níveis de albumina antes e após o tratamento de DM1. Como resultado, observamos uma redução na expressão do miR-100-5p em pacientes com MIC, sugerindo um papel protetor na nefropatia. Além disso, os níveis de expressão entre os grupos (Não vs. EUA) não foram significativos ao comparar os miRNAs miR-501-3p e miR-143-3p. Por fim, o miR-143-3p e o miR-100-5p foram associados a alguns genes-alvo, como *AKT1*, *MMP13* e *IGF1R*, que estão conectados a vias de sinalização e metabolismo celular.

Palavras-chave: doença renal diabética; nefropatia diabética; diabetes mellitus tipo 1; miRNAs; hsa-miR-100-5p.

ABSTRACT

Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) can generate severe complications, such as Diabetic Kidney Disease (DKD) or Diabetic Nephropathy (DN), with it emerging as the leading cause of terminal (end-stage) renal disease all over the world. For T1DM, the clinical evaluation of DKD uses markers such as the Glomerular Filtration Rate (GFR) and the Urinary Albumin Excretion (UAE). However, early diagnosis of DKD is still a challenge. For this reason, investigating molecular markers, including microRNAs (miRNAs), offers a promising perspective to an early diagnosis, highlighting the stability and the ability to reflect incipient molecular manifestations. Thus, here we investigated four miRNAs (hsa-let-7i-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-501-3p, and hsa-miR-100-5p) regarding nephropathy in patients with T1DM, considering the albuminuria (micro and macro) as a standard to evaluate the groups. In addition, we analyzed the effect of vitamin D in albumin levels before and after treatment for T1DM. As a result, we found a reduced expression of miR-100-5p in patients with MIC, indicating a protective role in nephropathy. Beyond that, expression levels between the groups (Non vs. UAE) were not significant when comparing the miRNAs miR-501-3p and miR-143-3p. Finally, miR-143-3p and miR-100-5p were linked to some target genes such as *AKT1*, *MMP13*, and *IGF1R*, that are connected to signal pathways and cellular metabolism.

Keywords: diabetic kidney disease; diabetic nephropathy; type 1 diabetes mellitus; miRNAs; hsa-miR-100-5p.

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença que pode apresentar diferentes classificações, dependendo de suas causas e manifestações clínicas, sendo os principais o diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e o diabetes gestacional (DMG). Cada tipo possui características distintas, com causas, fatores de risco e tratamentos específicos (KHAN et al., 2019).

O diabetes mellitus tipo 2 corresponde à maioria dos casos diagnosticados. Nesse tipo de diabetes, o organismo não utiliza adequadamente a insulina produzida ou não produz insulina suficiente para controlar os níveis de glicose no sangue (KHAN et al., 2019; MASTROTOTARO; RODEN, 2021). O estilo de vida sedentário, obesidade e predisposição genética são alguns fatores de risco associados ao diabetes tipo 2. O tratamento geralmente envolve mudanças na dieta, prática regular de exercícios físicos, perda de peso, medicamentos orais ou, em casos mais graves, o uso de insulina (KHAN et al., 2019; MARTÍN-PELÁEZ; FITO; CASTANER, 2020; WU et al., 2014).

O diabetes mellitus tipo 1, conhecido como diabetes insulino dependente ou diabetes juvenil, é uma doença metabólica crônica caracterizada pela destruição autoimune das células beta pancreáticas produtoras de insulina (AKIL et al., 2021). Essa forma de diabetes é mediada por mecanismos imunológicos complexos, nos quais células do sistema imunológico, como linfócitos T, infiltram o pâncreas e atacam as células beta pancreáticas ocasionando a insulinite (BURRACK; MARTINOV; FIFE, 2017).

O processo de diagnóstico do DM1 envolve uma avaliação clínica abrangente, começando pela identificação de sintomas como sede excessiva, fome aumentada, perda de peso não intencional, fadiga e micção frequente. Além disso, é importante considerar o histórico médico do paciente, incluindo qualquer histórico familiar de diabetes ou outras condições médicas relevantes (HOLT et al., 2022).

Os testes laboratoriais desempenham um papel fundamental no diagnóstico. Um teste de glicose em jejum é conduzido após um período de não ingestão de alimentos por pelo menos 8 horas. Se os níveis de glicose no sangue estiverem acima de 126 mg/dl (7 mmol/L) em duas ocasiões diferentes, isso sugere a presença de diabetes. Outro teste importante é a medição da hemoglobina A1c (HbA1c), que reflete os níveis médios de glicose no sangue ao longo de um período de 2 a 3 meses. Um valor igual ou superior a

6.5% indica diabetes. O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) envolve a ingestão de uma quantidade padronizada de glicose, com monitoramento dos níveis de glicose no sangue em intervalos regulares. Se a glicose plasmática estiver igual ou superior a 200 mg/dl (11.1 mmol/L) duas horas após a ingestão, o diagnóstico de diabetes é confirmado (LUCIER; WEINSTOCK, 2023; “Standards of Medical Care in Diabetes—2015 Abridged for Primary Care Providers”, 2015).

1.1. EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES

O diabetes mellitus (DM) é um preocupante e crescente questão de saúde pública tanto no Brasil quanto globalmente, conforme relatórios da *International Diabetes Federation* (IDF) essa condição afeta cerca de 536,6 milhões de pessoas no mundo, aproximadamente 32 milhões na região da América do Sul e Central e 16,8 milhões de indivíduos apenas no Brasil. As projeções da IDF são ainda mais inquietantes, estimando um notável aumento nos casos de diabetes até o ano de 2045, onde a estimativa é de 783,2 milhões de pessoas, não somente nos países latino-americanos, mas em todo o globo (MAGLIANO; BOYKO, 2021).

Quando observado de uma perspectiva nacional, a prevalência do diabetes mellitus nos estados brasileiros variou de 5-9% em 2019, sendo mais acentuada nos estados das regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Sudeste. Notavelmente, uma análise retrospectiva da progressão da doença no período de 2013 a 2019 revelou uma diminuição em alguns estados, com destaque para o Estado do Amapá com redução de 10-25%, sendo o único da Região Norte com esse decréscimo, enquanto o Estado do Pará apresentou um aumento de 10-25% (Figura 1) (REIS et al., 2022).

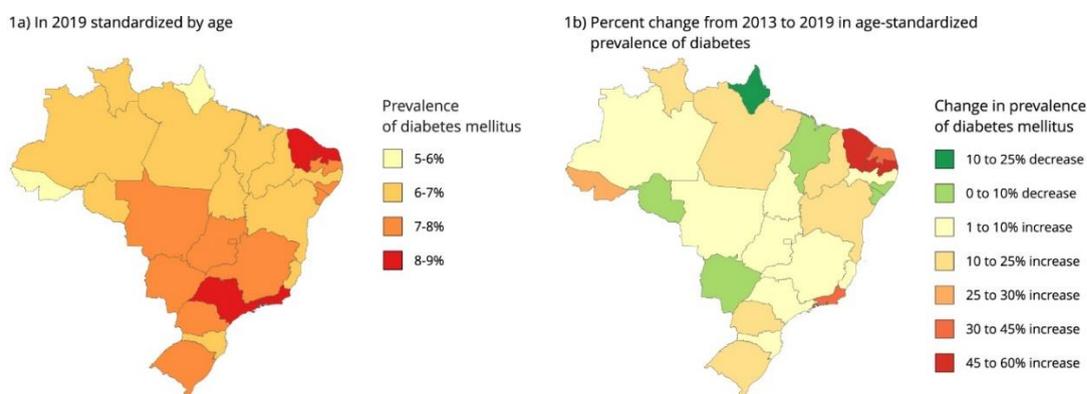


Figura 1. Epidemiologia da Diabetes no Brasil. FONTE: (REIS et al., 2022).

O DM1, embora represente uma parcela minoritária, entre 5 a 10% dos casos totais de diabetes no Brasil (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2023) representa uma preocupação crescente na saúde global. Com estimativas apontando para cerca de 8,4 milhões de pessoas afetadas em todo o mundo. No Brasil, em 2022, aproximadamente 588 mil brasileiros viviam com DM1, distribuindo-se em 112 mil jovens abaixo de 20 anos, 402 mil adultos entre 20 e 59 anos, e 71 mil indivíduos acima de 60 anos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021).

A projeção para o futuro é igualmente inquietante, com estimativas sugerindo que até 2040 o número de pessoas vivendo com DM1 no mundo poderá atingir a faixa de 13,5 a 17,4 milhões. Essa tendência alarmante aponta para um potencial problema de saúde pública que requer uma abordagem abrangente e imediata (OGROTIS; KOUFAKIS; KOTSA, 2023).

De fato, o DM1 impõe desafios significativos para a saúde e o bem-estar dos pacientes, o que pode impactar a expectativa de vida. Segundo a IDF, a estimativa de vida de uma criança diagnosticada com DM1 aos 10 anos de idade, no Brasil, varia entre 40 e 54 anos (Figura 2) (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021), em comparação com a média de 77 anos da população brasileira em geral (IBGE, 2022). Essa disparidade na expectativa de vida realça a importância de cuidados médicos especializados, gestão adequada da doença e atenção contínua para mitigar complicações e garantir uma melhor qualidade de vida para os pacientes.

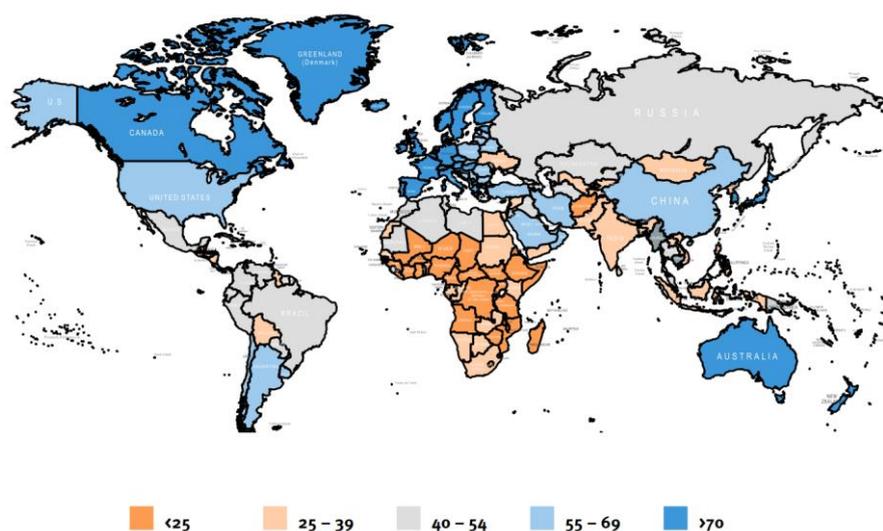


Figura 2. Estimativa de vida total de uma criança de 10 anos diagnosticada com DM1 em 2022. FONTE: (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021)

1.2. COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS E A NEFROPATIA

Tanto o DM1 quanto o DM2 podem levar a complicações características da doença quando os níveis glicêmicos não estão controlados adequadamente, bem como quando os indivíduos apresentam dislipidemias (WU et al., 2022). Atualmente, não existem medicamentos capazes de interromper a progressão da doença, sendo os tratamentos disponíveis apenas paliativos. A persistência da hiperglicemia acarreta um desequilíbrio homeostático que resulta em complicações como neuropatia (danos aos nervos periféricos), problemas micro e macro vasculares, como retinopatia, cardiomiopatia diabética e nefropatia (lesão renal) (CIEŹKI et al., 2022; WU et al., 2022).

Nesse contexto, a nefropatia diabética (ND) ou doença renal diabética (DRD) é uma doença crônica que se caracteriza pela perda gradual da função renal. Seu avanço contínuo e progressivo é acompanhado por sintomas inespecíficos, o que pode dificultar a identificação e o tratamento precoce dessa condição. A nefropatia diabética pode ser classificada em pelo menos cinco estágios (SAMSU, 2021), mas estes estágios não necessariamente são progressivos – por exemplo, nem todo indivíduo no estágio I evoluirá obrigatoriamente para os demais.

No estágio I, os pacientes apresentam microalbuminúria, que se refere à detecção de níveis moderados de albumina na urina, geralmente entre 30 e 300 mg/24h. À medida que a doença progride, ocorre a transição para o estágio II, no qual os indivíduos desenvolvem proteinúria, caracterizada por uma excreção urinária de albumina superior a 300 mg/24h. Nesse estágio, a proteinúria se intensifica, indicando uma perda ainda maior de proteínas. No estágio III, observa-se uma proteinúria ainda mais elevada e descontrolada, evidenciando o comprometimento significativo da função renal. No estágio IV, há uma diminuição na taxa de filtração glomerular, o que leva a um aumento nos níveis de creatinina sérica, indicando uma deterioração adicional da função renal. Por fim, no estágio V, ocorre a perda completa da função renal, levando o paciente a necessitar de terapias de substituição renal, como a diálise ou transplante renal, representando uma grande perda de qualidade de vida para o indivíduo (PAPADOPOULOU-MARKETOU et al., 2018; SAMSU, 2021).

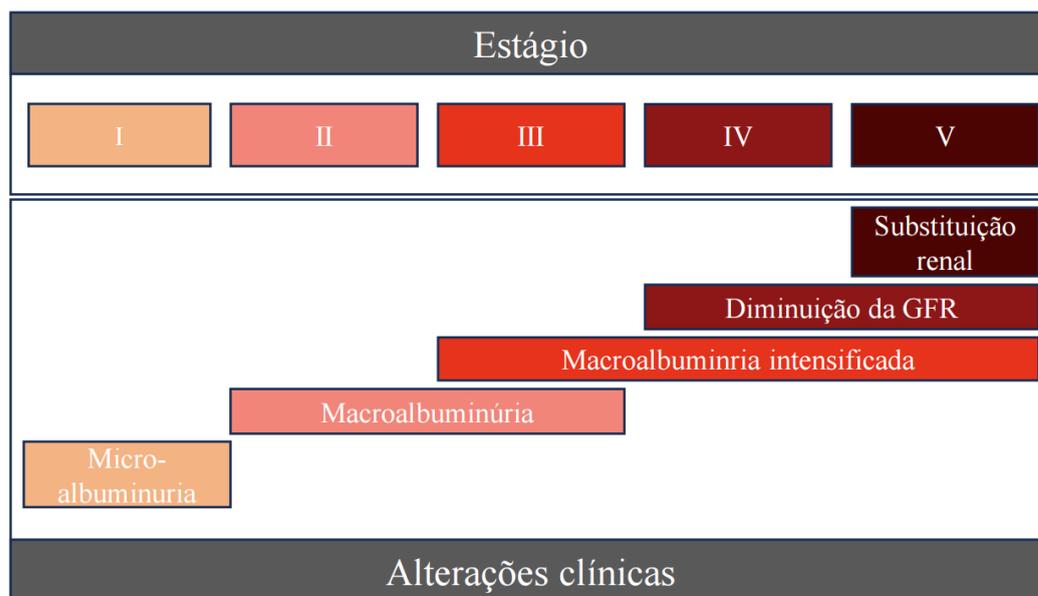


Figura 3. Evolução clínica da nefropatia diabética em cinco estágios.

A nefropatia diabética é uma complicação complexa e multifatorial, cuja etiologia ainda não está completamente elucidada. No entanto, até o momento, sabe-se que esse processo de adoecimento pode ser desencadeado por mecanismos celulares envolvidos no estresse oxidativo e na morte celular, culminando no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e desencadeando a disfunção renal (EREKAT, 2022; PAPADOPOULOU-MARKETOU et al., 2018; YANG; LIU, 2022).

O ponto de partida para o desenvolvimento da ND é a persistência hiperglicêmica conjuntamente com a hipertensão, ambas as condições característica do diabetes. A elevação crônica dos níveis de glicose no sangue leva à ativação de diversas vias metabólicas, como a via dos polióis e a via da hexosamina, resultando no acúmulo de moléculas como sorbitol e frutose, além da formação de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) por meio da glicosilação não enzimática de proteínas (PAPACHRISTOU; PAFILI; PAPANAS, 2021).

O acúmulo de AGEs desencadeia respostas inflamatórias e estresse oxidativo nas células renais, com a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MILOUDI et al., 2019). Essas moléculas altamente instáveis causam danos oxidativos às células endoteliais glomerulares (GECs), que revestem os vasos sanguíneos nos rins. Esse cenário leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6). A disfunção endotelial induz ainda a

expressão de moléculas de adesão celular, como ICAM-1 e VCAM-1, além de fatores inflamatórios, como a proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), facilitando a adesão e a migração das células inflamatórias para o tecido renal (BARRETT et al., 2017; YANG; LIU, 2022).

Ainda sobre os fatores expressos em resposta ao estresse celular, destaca-se também o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é uma molécula essencial na regulação da angiogênese, cuja expressão aumenta em resposta à hiperglicemia e estresse oxidativo. O VEGF promove a proliferação e permeabilidade dos vasos sanguíneos, contribuindo para a formação de novos vasos e, nos rins, acarreta a perda da seletividade da barreira glomerular, prejudicando ainda mais a função renal e contribuindo para a progressão da ND (ZHANG et al., 2020).

1.3. FATORES GENÉTICOS DO DIABETES TIPO 1

Genes diretamente associados aos processos patológicos dessa doença desempenham um papel fundamental em seu desenvolvimento e progressão. Entre esses, destacam-se os genes envolvidos na apresentação de antígenos, particularmente os do Complexo Principal de Histocompatibilidade II (MHC II), que têm sido amplamente estudados. (GOODWIN, 2019; KIM et al., 2021). Nesse contexto, genes não pertencentes ao MHC, mas que estão relacionados aos mecanismos imunológicos de tolerância central e periférica, também apresentam relevância significativa na predisposição ao diabetes. (WARSHAUER et al., 2021). Adicionalmente, as vias de sinalização insulínica, por meio da interação de seus genes específicos, como esperado, emergem como atores principais na modulação do risco de desenvolvimento da doença (GOOTJES et al., 2022). Os principais genes desses grupos estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Caracterização de genes associados ao diabetes tipo 1.

Genes	Função	Correlação com a Diabetes Tipo 1	Referência(s)
<i>HLA-DQA1</i>	Antígeno leucocitário humano de classe II	Predisposição genética à DM1 e autoimunidade	(GOOTJES et al., 2022; YUAN; MERINO; LARSSON, 2023)
<i>HLA-DQB1</i>	Antígeno leucocitário humano de classe II		
<i>HLA-DRB1</i>	Antígeno leucocitário humano de classe II		

<i>INS</i>	Pré-proinsulina	Influência na expressão de insulina, resultando em seleção inadequada de células T autorreativas e autoimunidade	
<i>PTPN22</i>	Tirosina fosfatase não receptora	Susceptibilidade genética para DM1	
<i>IL2RA</i>	Receptor da interleucina 2	Polimorfismos associados à DM1 e resposta autoimune	
<i>CTLA4</i>	Antígeno citotóxico linfocitário T4	Risco de desenvolvimento de DM1	
<i>IFIH1</i>	Helicase indutora de interferon 1	Resposta autoimune em DM1	
<i>ERBB3</i>	Receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 3	Patogênese do DM1	
<i>SH2B3</i>	Adaptador da proteína da família Src	Risco de desenvolvimento de DM1	
<i>CD226</i>	Molécula de adesão de células naturais (DNAM-1)	Regulação da resposta imunológica em DM1	(YUAN; MERINO; LARSSON, 2023)

Estudos recentes revelaram uma correlação significativa entre o desenvolvimento e a gravidade da DM1 e os níveis séricos de 25-hidroxitamina D [25(OH)D] ou vitamina D (FERRAZ et al., 2022a; HUANG; WEN; YE, 2022; NAJJAR et al., 2021; PIKE; CHRISTAKOS, 2017). Essa associação deriva, em parte, do papel metabólico crucial desempenhado por esse hormônio em várias vias intracelulares, especialmente aquelas relacionadas ao sistema imune (AO; KIKUTA; ISHII, 2021). Especificamente, destaca-se a habilidade da 25(OH)D em induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, em células dendríticas, assim como a IL-4, que por sua vez desempenha um papel essencial na polarização da resposta imunológica em direção ao perfil Th2, caracterizado por sua atividade anti-inflamatória e capacidade de promover a reparação tecidual. Adicionalmente, a forma ativa da 25(OH)D também parece exercer um papel crucial na inibição da secreção de moléculas pró-inflamatórias, como o TNF-alfa e o INF-gama (AO; KIKUTA; ISHII, 2021; BERER et al., 2000; JOSHI et al., 2011). É importante destacar que esse perfil contrasta com o padrão observado na DM1, ressaltando ainda mais a importância dessas descobertas para a compreensão e o manejo dessa condição autoimune.

Há indícios de que variantes presentes em genes relacionados à via biosintética e metabólica da 25(OH)D desempenhem um papel fundamental no surgimento e na manutenção do DM1, podendo influenciar os níveis de vitamina D no organismo e afetar assim a suscetibilidade ao desenvolvimento dessa condição (FERRAZ et al., 2022a; MANOUSAKI et al., 2021; NAJJAR et al., 2021). No Quadro 2, são apresentados alguns achados relevantes que relacionam essas variantes genéticas com os níveis de 25(OH)D.

Quadro 2. Polimorfismos já associados aos níveis de vitamina D.

Gene	Polimorfismo	Observação	Referências
<i>CYP2R1</i>	rs10741657	Melhora na absorção de 25(OH)D	(CERNEA; DOBREANU; RAZ, 2010; PASCHOU et al., 2018)
<i>CYP2R1</i>	rs117913124	Sem efeito significativo	(HUBER et al., 2008)
<i>DHCR7/NADSYN1</i>	rs12785878	Aumento do risco de deficiência de 25(OH)D	(NAJJAR et al., 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016)
<i>GC</i>	rs3755967	Melhora na disponibilidade de 25(OH)D	(PIKE; CHRISTAKOS, 2017)
<i>CYP24A1</i>	rs17216707	Diminuição na ativação da 25(OH)D	(JIANG; KIEL; KRAFT, 2019)
<i>AMDHD1</i>	rs10745742	Desconhecido	(WANG; ZHU; DELUCA, 2012)
<i>SEC23A</i>	rs8018720	Desconhecido	(INFANTE et al., 2019)
<i>VDR</i>	rs1544410	Níveis mais baixos de 25(OH)D em indivíduos com genótipo AA	(FERRAZ et al., 2022a)
	rs731236	Níveis mais baixos de 25(OH)D em indivíduos com genótipo CC	
	rs2228570	Níveis mais altos de 25(OH)D em indivíduos com genótipo TT	
	rs2228570	Sem efeito significativo em indivíduos com genótipos CC + TC	

Compreendida a relevância da vitamina D na predisposição ao surgimento do DM1 – como seu impacto na secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, o estímulo à produção de transportadores de glicose em células periféricas e sua notável atuação na regulação do sistema imune –, justifica-se o seu uso no tratamento do DM1 (INFANTE et al., 2019; WU et al., 2023).

1.4. FATORES EPIGENÉTICOS DO DIABETES TIPO 1

Conforme mencionado anteriormente, o DM1 está fortemente associado a fatores genéticos. No entanto, considerando a complexidade do organismo humano, outros elementos moleculares também podem desempenhar um papel significativo no desenvolvimento do DM1. Entre esses elementos, os processos de regulação da expressão gênica pré- e pós-transcricional têm recebido atenção crescente (AKIL et al., 2020; FERRAZ et al., 2022b; JERRAM; DANG; LESLIE, 2017; PANG et al., 2022).

Estudos recentes de associação quantitativa de *loci* metilados (mQTL) demonstraram que genes envolvidos em processos biológicos importantes, como secreção de insulina, ciclo celular e resposta imunológica, podem apresentar padrões distintos de metilação e expressão em indivíduos com DM1 em comparação com aqueles sem a doença. Essas alterações epigenéticas impactam na função dos genes relacionados e, por sua vez, afetam a suscetibilidade ao desenvolvimento e progressão do DM1 (AKIL et al., 2020; JERRAM; DANG; LESLIE, 2017). O Quadro 3 mostra genes que são epigeneticamente modulados já descritos na literatura em relação ao DM1.

Quadro 3. Genes epigeneticamente modulados já descritos na literatura como relacionados ao DM1.

Gene	Processos Biológicos	Referências
<i>Integrin subunit beta 3 binding protein (ITGB3BP)</i>	Transdução de sinal; adesão celular; migração celular; regulação do ciclo celular	(YE et al., 2018)
<i>AF4/FMR2 family member 3 (AFF3)</i>	Regulação da transcrição gênica; regulação da expressão gênica	

<i>Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2 (PTPN2)</i>	Regulação da sinalização intracelular; modulação da resposta imunológica	
<i>Cathepsin H (CTSH)</i>	Processamento de proteínas; resposta imunológica; inflamação	
<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4)</i>	Regulação da resposta imunológica; modulação da ativação de linfócitos T	
<i>Glutathione peroxidase 7 (GPX7)</i>	Detoxificação de peróxidos; proteção contra o estresse oxidativo; homeostase das células beta pancreáticas	(OLSSON et al., 2014)
<i>Glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1)</i>	Detoxificação de substâncias xenobióticas; metabolismo celular; homeostase das células beta pancreáticas	
<i>Sorting nexin 19 (SNX19)</i>	Endocitose; reciclagem de proteínas; homeostase das células beta pancreáticas	

1.5. RNAs NÃO CODIFICANTES E OS miRNAs

Os RNAs não codificantes (do Inglês, *non-coding RNAs* ou ncRNA) correspondem a uma classe de moléculas que não estão diretamente envolvidas com a síntese de proteínas, mas desempenham papéis cruciais na atividade celular, como diferenciação, controle de proliferação e regulação da expressão gênica (HE et al., 2023). Os ncRNAs são divididos em duas categorias: funcionais e regulatórios. Estes últimos são subdivididos em duas outras classes, conforme o tamanho: os *Long Non-coding RNAs* (lncRNAs), com mais de 200 nucleotídeos (200 nt) (MATTICK et al., 2023), e os *Short* ou *Small Non-coding RNAs* (sncRNAs), com 18–200 nt (WATSON; BELLI; DI PIETRO, 2019).

Entre os sncRNAs estão os miRNAs, pequenas moléculas compostas por aproximadamente 22 nucleotídeos e produzidas intracelularmente como RNAs não codificantes (ncRNAs) reguladores. Desempenhando um papel crucial em diversas vias biológicas fundamentais e influenciando múltiplas funções celulares, esses miRNAs têm

o poder de induzir tanto condições normais quanto patológicas em variados sistemas biológicos por sua atuação no silenciamento do RNA mensageiro (mRNA) (O'BRIEN et al., 2018).

Inicialmente, a biogênese começa com a transcrição de genes específicos que codificam pri-miRNAs, que são longas moléculas de RNA com estruturas em forma de laço. Essas moléculas são processadas no núcleo por um complexo enzimático que inclui a proteína Drosha e DGCR8, resultando na formação de pre-miRNAs, que são intermediários de miRNA com uma estrutura de haste (Figura 2) (O'BRIEN et al., 2018; WATSON; BELLI; DI PIETRO, 2019).

Após a formação do pre-miRNA, este é transportado do núcleo para o citoplasma, um passo mediado pela proteína exportina-5. Uma vez no citoplasma, o pre-miRNA é clivado pela enzima Dicer, que remove a parte da alça, gerando um duplex de miRNA de cadeia dupla. Este duplex é composto por duas fitas de RNA, mas apenas uma delas, geralmente a que é menos estável, é incorporada ao complexo RISC (RNA-induced silencing complex), enquanto a outra fita é degradada. O miRNA que se liga ao RISC desempenha um papel crucial na regulação da expressão gênica. Ele se liga a regiões específicas dos mRNAs-alvo, frequentemente na região 3' UTR (*untranslated region*), o que pode levar à degradação do mRNA ou à inibição da tradução (WATSON; BELLI; DI PIETRO, 2019).

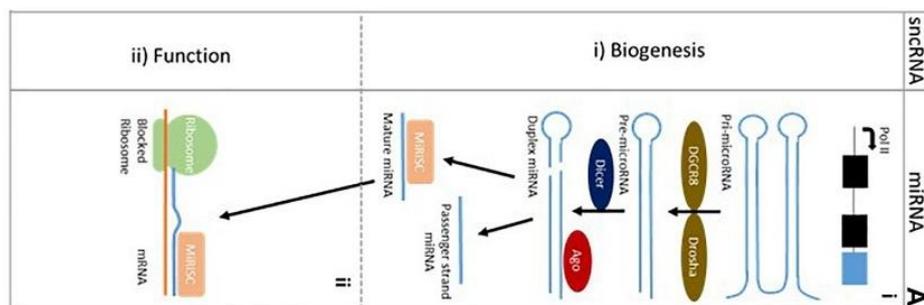


Figura 4. Biogênese e função de miRNAs. Fonte: Adaptado de (WATSON et al., 2019).

Essa capacidade de regular a expressão gênica torna os miRNAs essenciais em diversos processos biológicos, incluindo desenvolvimento, diferenciação celular e resposta a estresses celulares. Além disso, a disfunção na biogênese ou na ação dos miRNAs está associada a várias doenças, incluindo doenças renais decorrentes da complicação da DM como a ND (BHATT; KATO; NATARAJAN, 2016; NASCIMENTO; DOMINGUETI, 2019).

É importante ressaltar que mesmo alterações sutis nos níveis de miRNAs podem acarretar efeitos significantes nas células. Sabe-se que mudanças na expressão destes miRNAs estão associadas ao desenvolvimento de diversas doenças humanas (BARUTTA et al., 2022). Por exemplo, pesquisas têm demonstrado que miRNAs específicos associados ao DM2, como miRNA-29a-3p, miRNA-122-5p, miRNA-124-3p e miRNA-320a, exibiram redução em seus níveis após a realização de cirurgia bariátrica em indivíduos obesos, o que aparentemente está relacionado à melhora na secreção de insulina, redução da resistência à insulina e proteção da função das células beta pancreáticas (ZHU et al., 2017).

De fato, os miRNAs emergem como importantes reguladores na fisiologia dos rins e seu papel tem sido cada vez mais reconhecido na patogênese de diversas doenças renais. No contexto da nefropatia diabética, estudos têm apontado para um impacto significativo dos miRNAs no desenvolvimento e manutenção da condição (BHATT; KATO; NATARAJAN, 2016; NASCIMENTO; DOMINGUETI, 2019). Quando analisados sob a perspectiva dos principais componentes subjacentes e progressivos da nefropatia – ou seja, a transição epitélio-mesenquimal (EMT) das células renais, a hipertrofia glomerular, a fibrose e a inflamação tecidual – os miRNAs exibem uma natureza dual, apresentando efeitos tanto protetores quanto patogênicos nesses processos.

Assim, diversos estudos têm se concentrado em investigar o impacto de miRNAs amplamente investigados nas doenças renais. Um exemplo notável reside no miR-21, o qual exibe um efeito protetor ao interagir com diversos genes, incluindo a via de sinalização da fosfatase e tensina homóloga (*Phosphatase and tensin homolog* – PTEN) (MAHTAL et al., 2022). Em condições normais, vale destacar que o *PTEN* desempenha um papel de supressor tumoral, porém, na doença renal induzida pelo diabetes, é implicado no processo de transição epitélio-mesenquimal (LI et al., 2019). A Figura 4 esclarece e sumariza os principais achados sobre os principais miRNAs já investigados no contexto da ND.

b

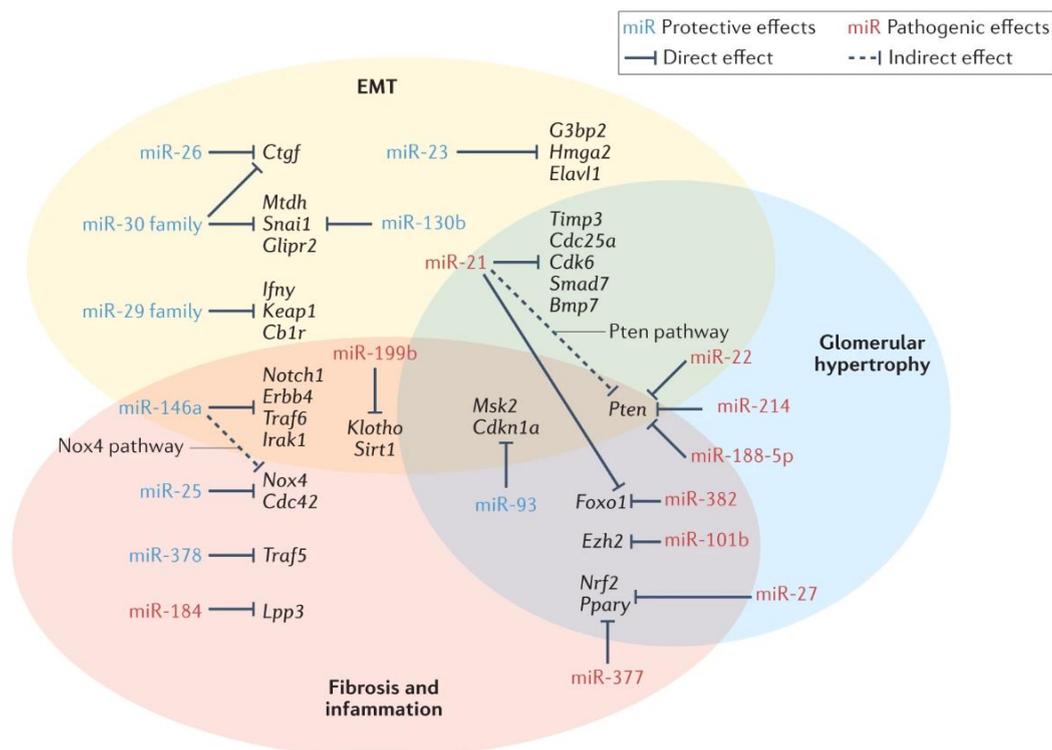


Figura 5. Principais miRNAs já investigados no desenvolvimento da ND. FONTE: (MAHTAL et al., 2022)

Recentemente, Ferraz et al. (2022b) conduziram uma pesquisa que revelou miRNAs diferencialmente expressos em uma coorte brasileira, sugerindo uma alta contribuição de processos metabólicos mitocondriais na patogênese do DM: hsa-miR-26b-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-143-3p e hsa-miR-501-3p. Além disso, a disfunção mitocondrial tem sido implicada como um componente chave na fisiopatologia da ND. Alterações nos miRNAs que regulam processos metabólicos celulares como um todo, nucleares e mitocondriais, podem influenciar diretamente a homeostase energética e a resposta celular ao estresse oxidativo, contribuindo para a disfunção renal observada na ND (AHMAD; DRAVES; ROSCA, 2021; FERRAZ et al., 2022b; MIMA, 2022).

1.5.1. miRNAs COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES

A identificação precoce de indivíduos com DM é de extrema importância para o tratamento eficaz e para evitar complicações crônicas, como a nefropatia diabética (AKIL et al., 2021). Atualmente, o diagnóstico da DM é baseado em critérios clínicos, como a glicemia de jejum elevada e a presença de sintomas característicos e detecção de autoanticorpos contra antígenos das ilhotas pancreáticas ICA, IAA, IA-2, IA-2 β , GADA e ZnT8. Todavia, esses biomarcadores não são indicadores confiáveis para reconhecer

indivíduos em risco de desenvolver o DM1, pois, embora a maioria dos indivíduos no início do DM1 teste positivo para alguns autoanticorpos, nem todos progredirão para desenvolver a doença, tornando difícil distinguir aqueles que serão afetados daqueles que não serão (GUAY; REGAZZI, 2013).

Nesse contexto, os microRNAs têm sido amplamente investigados como potenciais biomarcadores para o diagnóstico precoce do Diabetes Mellitus (DM). Alguns miRNAs estão correlacionados com a presença e a gravidade da doença, tornando-os candidatos promissores para esse propósito. Exemplos incluem os cinco miRNAs destacados por FERRAZ et al., 2022b, que apresentam expressão diferencial em pacientes com DM Tipo 1. Da mesma forma, busca-se avaliar a aplicação desses miRNAs no diagnóstico precoce de outras condições associadas ao DM Tipo 1, como a nefropatia diabética (ND). A análise desses e de outros miRNAs pode facilitar a detecção precoce de diversas condições patológicas em estágios iniciais, permitindo a rápida identificação do estadiamento e possível progressão da doença, o que possibilita intervenções terapêuticas mais eficazes.

Quando se trata da nefropatia diabética, a identificação precoce é ainda mais crucial, uma vez que a ND é uma das principais complicações do diabetes e é uma das maiores causadoras de doença renal crônica em todo o mundo (WU et al., 2022). Nesse contexto, os miRNAs também têm mostrado um grande potencial como biomarcadores no diagnóstico e monitoramento da ND, considerando que estudos têm identificado miRNAs específicos associados ao desenvolvimento e progressão da ND. Por exemplo, o miR-126 tem sido relacionado a um efeito nefro-protetor, e sua redução na urina foi associada ao desenvolvimento da ND (NASCIMENTO; DOMINGUETI, 2019).

Em resumo, os miRNAs têm se mostrado como potenciais biomarcadores tanto no diagnóstico precoce do diabetes mellitus tipo 1 quanto no diagnóstico da nefropatia diabética. Sua detecção em amostras de sangue e urina pode fornecer informações importantes para o manejo adequado dessas condições, permitindo intervenções terapêuticas precoces e reduzindo o risco de complicações crônicas associadas ao DM1. No entanto, são necessárias mais pesquisas para validar plenamente o uso dos miRNAs como biomarcadores na prática clínica.

2. JUSTIFICATIVA

A Nefropatia Diabética (ND) é uma complicação grave e progressiva do diabetes mellitus, que afeta significativamente a qualidade de vida dos pacientes e representa uma das principais causas de doença renal crônica em todo o mundo. Apesar de décadas de pesquisa e avanços no tratamento do DM1, ainda não se compreende completamente a fisiopatologia subjacente à ND. Portanto, é essencial aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos moleculares envolvidos nessa condição, a fim de identificar novos alvos terapêuticos e desenvolver abordagens mais eficazes para retardar ou prevenir sua progressão (PAPADOPOULOU-MARKETOU et al., 2018; REIS et al., 2022).

Atualmente, há um crescente interesse no papel dos microRNAs circulantes no sangue como biomarcadores e reguladores de processos biológicos envolvidos na patogênese de diversas doenças, incluindo a ND. Eles têm sido implicados na modulação de vias moleculares relacionadas ao estresse oxidativo, inflamação, fibrose e disfunção endotelial, processos que estão associados ao desenvolvimento e progressão da ND (BARUTTA et al., 2022; FERRAZ et al., 2022b; GUAY; REGAZZI, 2013).

O estudo dos microRNAs circulantes na ND pode fornecer informações valiosas sobre a assinatura molecular específica dessa condição e permitir a identificação de perfis moleculares associados a diferentes estágios da doença, desde o início até as fases mais avançadas. Além disso, o perfil de microRNAs circulantes pode ser uma ferramenta promissora para diagnóstico precoce, prognóstico e estratificação de risco em pacientes com DM1, bem como para monitorar a progressão da ND ao longo do tempo (BHATT; KATO; NATARAJAN, 2016; NASCIMENTO; DOMINGUETI, 2019).

Portanto, a investigação das alterações epigenéticas mediadas por miRNAs no DM1 e sua relação com a nefropatia diabética são fundamentais para o avanço do conhecimento científico nessa área. A compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes a essas alterações poderá proporcionar o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, prognóstico e terapia para o DM1, melhorando significativamente a qualidade de vida dos pacientes afetados por essa condição crônica e suas complicações nefrológicas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Investigar a expressão de microRNAs circulantes no diabetes mellitus tipo 1 em relação à nefropatia diabética.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a associação entre os níveis de expressão de miRNAs circulantes e os marcadores clínicos de nefropatia diabética antes e depois do tratamento com vitamina D;
- Investigar a função dos miRNAs identificados em diferentes processos biológicos relacionados à nefropatia diabética;
- Avaliar a capacidade dos miRNAs circulantes em estimar o risco de desenvolvimento e progressão da nefropatia diabética em pacientes com diabetes tipo 1.

4. CAPÍTULO 1

Este capítulo é referente ao artigo intitulado “Downregulation of hsa-miR-100-5p May Be a Protective Factor in the Early Stages of Nephropathy in Type 1 Diabetes Mellitus”, publicado na edição especial “Molecular Research on Type 1 Diabetes and Its Complications” do periódico científico *International Journal of Molecular Sciences* (Fator de Impacto: 4.9).



Communication

Downregulation of hsa-miR-100-5p May Be a Protective Factor in the Early Stages of Nephropathy in Type 1 Diabetes Mellitus

Andrey Henrique Gama Pinheiro ¹ , Beatriz de Oliveira Pereira ¹, Lilian Souza D'Albuquerque Silva ², Franciane T. Cunha de Melo ², Ana Carolina C. Braga de Souza ², Valéria S. Galvão Leal ², Priscila B. Barbosa de Figueiredo ² , João F. Abrahão Neto ², Marcia Costa dos Santos ², Natércia Neves Marques de Queiroz ², Karem Miléo Felício ², Ândrea Ribeiro-dos-Santos ¹ , João Soares Felício ^{2,*} and Giovanna C. Cavalcante ^{1,*}

¹ Laboratory of Human and Medical Genetics, Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Pará, Belém 66075-110, PA, Brazil; andrey.biomed@gmail.com (A.H.G.P.); oliverbibbia@gmail.com (B.d.O.P.); akelyufpa@gmail.com (Á.R.-d.-S.)

² Endocrinology and Metabolism /Diabetes Unit, João de Barros Barreto University Hospital, Federal University of Pará, Belém 66075-110, PA, Brazil; liliandalbuquerque@gmail.com (L.S.D.S.); franciane.melo@hotmail.com (F.T.C.d.M.); carol.souza25@hotmail.com (A.C.C.B.d.S.); valeriasuenya@gmail.com (V.S.G.L.); pribfigueiredo@gmail.com (P.B.B.d.F.); jfabrahao2018@gmail.com (J.F.A.N.); marciacsantos29@gmail.com (M.C.d.S.); natercianeves@hotmail.com (N.N.M.d.Q.); karemfelicio@yahoo.com.br (K.M.F.)

* Correspondence: felicio.bel@terra.com.br (J.S.F.); giovannacavalcante@gmail.com or giovannac@ufpa.br (G.C.C.)



Citation: Pinheiro, A.H.G.; Pereira, B.d.O.; Silva, L.S.D.; Melo, F.T.C.d.; Souza, A.C.C.B.d.; Leal, V.S.G.; Figueiredo, P.B.B.d.; Neto, J.F.A.; Santos, M.C.d.; Queiroz, N.N.M.d.; et al. Downregulation of hsa-miR-100-5p May Be a Protective Factor in the Early Stages of Nephropathy in Type 1 Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 5663. <https://doi.org/10.3390/ijms25115663>

Academic Editor: Jolanta Neubauer-Geryk

Received: 16 April 2024

Revised: 10 May 2024

Accepted: 17 May 2024

Published: 23 May 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) can generate severe complications, such as Diabetic Kidney Disease (DKD) or Diabetic Nephropathy (DN), with it emerging as the leading cause of terminal (end-stage) renal disease all over the world. For T1DM, the clinical evaluation of DKD uses markers like the Glomerular Filtration Rate (GFR) and the Urinary Albumin Excretion (UAE). However, early diagnosis of DKD is still a challenge. For this reason, investigating molecular markers, such as microRNAs (miRNAs), offers a promising perspective to an early diagnosis, highlighting the stability and the ability to reflect incipient molecular manifestations. Thus, here we investigated four miRNAs (hsa-let-7i-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-501-3p, and hsa-miR-100-5p) regarding nephropathy in patients with T1DM, considering the albuminuria (micro and macro) as a standard to evaluate the groups. As a result, we found a reduced expression of miR-100-5p in patients with MIC, indicating a protective role in nephropathy. Beyond that, expression levels between the groups (Non vs. UAE) were not significant when comparing the miRNAs miR-501-3p and miR-143-3p. Finally, miR-143-3p and miR-100-5p were linked to some target genes such as AKT1, MMP13, and IGF1R, that are connected to signal pathways and cellular metabolism.

Keywords: diabetic kidney disease; diabetic nephropathy; type 1 diabetes mellitus; miRNAs; hsa-miR-100-5p

1. Introduction

Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) is the resulting condition of the autoimmune destruction of beta-pancreatic cells, which are responsible for insulin production. This condition increases blood glucose, causing alterations in various body systems, including cardiovascular and renal. These complications are not T1DM exclusive, but common to Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), and both are associated with molecular and metabolic changes due to the syndrome [1–3].

One of the most significant complications of diabetes is Diabetic Nephropathy (DN) or Diabetic Kidney Disease (DKD), a form of Chronic Kidney Disease (CKD) [4,5]. We can observe this medical condition's clinical evolution in Figure 1. These events result from

diverse structural molecular and cellular alterations, such as the epithelial–mesenchymal transition, glomerular hypertrophy, and fibrosis, all contributing to the progressive loss of kidney function [6]. Diabetic Kidney Disease (DKD) emerges as the leading cause of terminal renal disease in the world [7]. This complication significantly impacts 20 to 40% of patients diagnosed with Diabetes Mellitus (DM) [8].

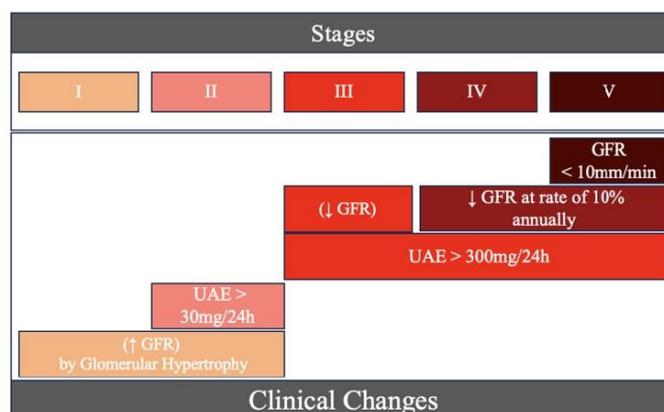


Figure 1. Five stages (I–V) of Diabetic Nephropathy's clinical evolution.

Triage protocols can change according to the type of diabetes diagnosed. For each patient with T2DM, the recommendation is to begin screening right after the diagnosis. Patients with T1DM should undergo it for five years after the diagnosis. It is crucial to highlight that there are specific protocols for teenagers, those in the pubertal phase, and individuals with uncontrolled glycemic levels; the screening must be conducted as soon as possible, and annually [5]. DKD's clinical evaluation is based on specific diagnostic criteria. Glomerular Filtration Rate (GFR) values of less than 60 mL/min/1.73 m and Urinary Albumin Excretion (UAE) with a sustained increase over a minimum period of three months are considered indicators of significant renal impairment. The increased UAE can be defined by the albumin quantification in 24 h urine, with values higher than 30 mg/24 h, or by an albumin/creatinine ratio (ACR) equal to or greater than 30 mg/g [4,7,9].

The continuous monitoring of GFR, combined with the measurement of UAE, provides not only the detection of DKD but also contributes to categorizing the disease into specific stages. This structured approach, with patient stratification in stages, enables the definition of appropriate therapeutic measures, tailored to the specific needs of each stage of DKD [9]. Despite UAE and GFR being widely used to monitor patients with DKD, these methods have limitations, especially regarding early diagnosis, because observed clinical manifestations already represent the consequences of alterations in renal physiology, so the early identification of DKD remains a challenge [10].

Therefore, studies have concentrated on identifying molecular markers that could improve DKD diagnosis. A notable example of this approach is the investigation of microRNAs (miRNAs), non-coding RNAs (ncRNAs) composed of approximately 20–22 nucleotides, which play a crucial role in regulating gene expression at the post-transcriptional level. These molecules perform their function by binding to mRNA's 3'UTR region, resulting in the suppression of translation or their degradation [11].

Investigating molecular markers such as miRNAs presents a promising prospect in mitigating the restrictions associated with conventional diagnostic methods and enabling the early identification of Diabetic Kidney Disease (DKD). This is based on the intrinsic stability of these miRNAs, which can reflect manifestations at molecular levels that are still

incipient [9,12]. Several research groups have identified miRNAs differentially expressed in patients with and without DKD, using biological samples such as serum and urine [6,9,13]. However, due to the heterogeneity of the population, these studies have faced challenges in reproducibility in different cohorts.

Thus, it is crucial to identify specific molecular signatures that can improve early diagnosis, especially in people from the North of Brazil, where genetic and environmental characteristics can markedly vary if compared with the rest of the country and the world [14]. This personalized approach can contribute to a more effective diagnosis and a therapeutic plan of action's implementation in the early management of DKD. Here, considering a previous study from our research group [15], we investigated four miRNAs (hsa-let-7i-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-501-3p e hsa-miR-100-5p) and their association with nephropathy in patients with T1DM from the North of Brazil. Additionally, other studies identified these five miRNAs, possibly involved in DRC, caused by T2DM or other diseases [16–19].

2. Results

2.1. Sample Characterization

After analyzing the clinical variables, we observed that there was a significant change between the clinical analytes studied related to DKD, according to the classification of albuminuria: normoalbuminuria or non-UAE (Non, n = 12), microalbuminuria (MIC, n = 4) and macroalbuminuria (MAC, n = 3). Table 1 shows the clinical characteristics of each studied group.

Table 1. Clinical characteristics of the different T1DM groups.

Variable	Non (n = 12)	MIC (n = 4)	MAC (n = 3)
BMI	23.1 ± 3.9	22.7 ± 2.2	29.8 ± 6.6
FBG	203.2 ± 101.3	76.3 ± 27.5	136.7 ± 23.4
GFR	121.8 ± 12.1	117.1 ± 26.5	83.7 ± 33.4
Creatinine	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.3	1.4 ± 0.2

Data are expressed as mean ± SD. BMI indicates Body Mass Index; FBG, Fasting Blood Glucose; and GFR, Glomerular Filtration Rate. FBG with multiple significant comparisons: MIC vs. Non ($p = 0.036$); GFR, MAC vs. Non ($p = 0.019$); Creatinine, MAC vs. MIC ($p = 0.001$) and MAC vs. Non ($p < 0.001$); Urea, MAC vs. Non ($p = 0.016$). No difference was observed in BMI between the groups ($p = 0.052$).

2.2. Characterization of miRNAs

We performed an analysis of four (let-7i-5p, mir-143-3p, mir-501-3p, mir-100-5p) of the five miRNAs, identified by Ferraz et al. [15] in the context of albuminuria in Diabetic Nephropathy. Figure 2A shows the relation between the Δ CT of the analyzed miRNAs; " Δ CT" represents the difference in cycle threshold (Ct) values between the endogenous reference gene and the target gene of interest. Although we had observed differences in the Δ CT rate of these miRNAs between the Non, MIC, and MAC groups, they were not statistically significant in all cases.

Figure 2B shows the relation between the Δ CT values of miRNAs hsa-let-7i-5p ($p = 0.078$), hsa-mir-143-3p ($p = 0.133$), hsa-mir-501-3p ($p = 0.133$) and hsa-mir-100-5p ($p = 0.030$) in individuals with microalbuminuria (MIC) and normoalbuminuria (Non). We observed that mean values of Δ CT for hsa-mir-100-5p were significantly higher in the MIC group when compared to the Non group, indicating the high expression of these miRNAs in the Non group. Figure 2C shows the comparison between the Δ CT values of these four miRNAs for Non and MAC groups; however, they were not statistically significant in all cases.

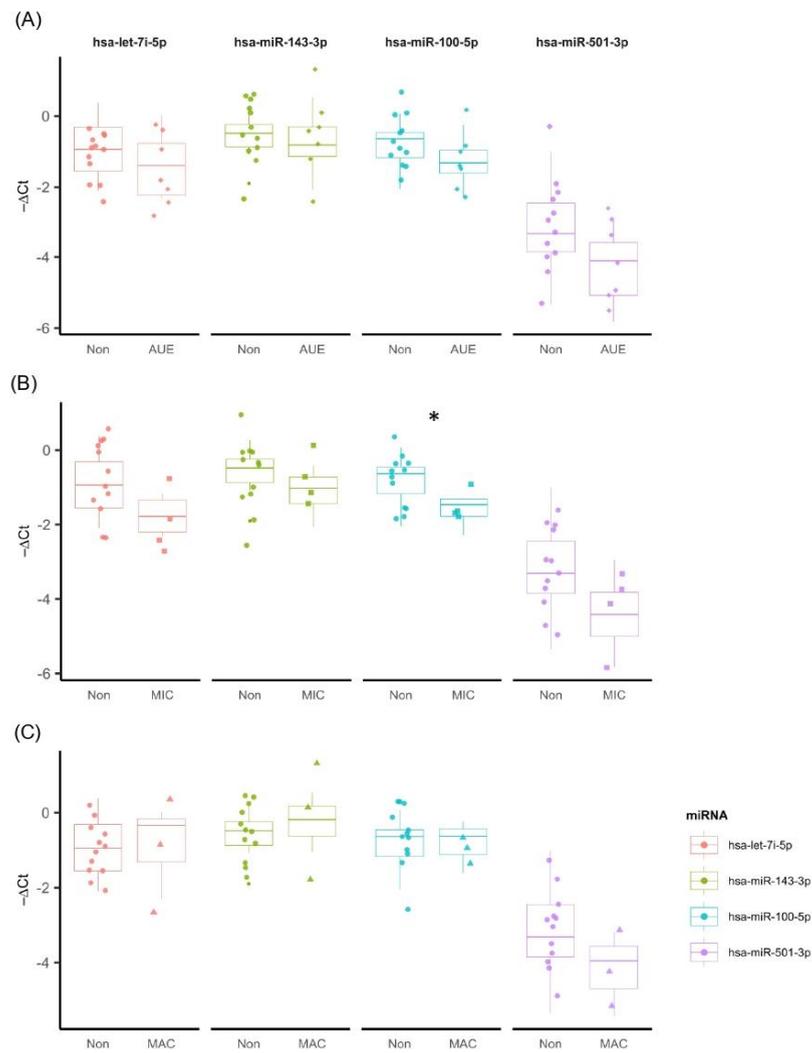


Figure 2. Expression profiles of the four miRNAs in three different conditions. (A) Non AUE (n = 12) and AUE (n = 7) patients: hsa-let-7i-5p ($p = 0.299$), hsa-mir-143-3p ($p = 0.592$), hsa-mir-501-3p ($p = 0.068$), and hsa-mir-100-5p ($p = 0.142$). (B) Comparison of $-\Delta Ct$ values between Non (n = 12) and MIC (n = 4): hsa-let-7i-5p ($p = 0.078$), hsa-mir-143-3p ($p = 0.133$), hsa-mir-501-3p ($p = 0.133$), and hsa-mir-100-5p ($p = 0.030$) *. (C) Comparison of the average $-\Delta Ct$ values between the Non (n = 12) and MAC (n = 3) groups for the miRNAs: hsa-let-7i-5p ($p = 0.840$), hsa-mir-143-3p ($p = 0.448$), hsa-mir-501-3p ($p = 0.233$), and hsa-mir-100-5p ($p = 1.000$).

3. Discussion

3.1. *hsa-let-7i-5p*

Three of these miRNAs were previously highlighted by other researchers, considering the identification of molecular biomarkers linked to albuminuria. In a context related to DKD in T2DM patients and other complications, Prabu et al. compared Non-UAE T2DM vs. MAC T2DM and observed the hyperregulation of *hsa-let-7i-5p* in extracellular vesicles present in the urine of patients [16]. In addition, the same authors identified four miRNAs (*hsa-let-7i-5p*, *miR-15b-5p*, *miR-24-3p*, *miR-27b-3p*) that together compose a molecular signature able to distinguish Non-UAE T2DM patients from UAE (MIC/MAC) patients, showing promising levels of sensitivity and specificity, with an AUROC above 85%—the AUROC (Area under the ROC Curve) is a performance metric that evaluates the discrimination of a model. An AUROC of 85% means that the model has a good discriminatory ability: 85% of the time, the model will correctly assign a higher absolute risk to a randomly selected patient with an event (DM UAE) than to a randomly selected patient without an event (DM Non-UAE) [20]. An AUROC higher than 85% represents good performance [21] and demonstrates that, to some extent, *hsa-let-7i-5p* contributes to a miRNA signature present in individuals with DKD, suggesting a possible involvement of this miRNA in this pathological process.

Following the analysis, when the authors investigated the target genes associated with these miRNAs and their biological interaction, three protein networks were identified: one involving the Wnt/ β -catenin signaling cascade, one involving activin receptor signaling, and the last involving the cell differentiation and proliferation [16].

The Wnt/ β -catenin signaling pathway plays an essential role in the modulation of cellular proliferation, differentiation, and organ development, including the kidney. Its inappropriate activation has been linked to a variety of kidney disorders, including DKD. Similarly, activin receptor signaling is related to the cell's growth regulation, differentiation, and immune response, and it is also associated with kidney disorders such as renal fibrosis. Beyond that, the regulation of cell differentiation and proliferation plays a crucial role in the pathophysiology of DKD, since cell dysfunction and uncontrolled proliferation can contribute significantly to the progression of kidney disease [22–24].

3.2. *hsa-miR-143-3p*

Additionally, in individuals diagnosed with arterial hypertension and CKD, a study conducted by Perez-Hernandez and colleagues [17] observed an upregulation of *miR-143-3p*, especially in urinary exosomes. It is suggested that *miR-143-3p* is one of the molecular components implicated in the loss of plasma proteins. This intriguing molecular mechanism of plasma protein loss can occur due to factors both external and internal to renal anatomy and physiology [25]. A promising mechanism is the effect caused by the overexpression of *miR-143-3p*, observed in podocytes, which, when stimulated by TGF- β , showed an increase in this miRNA's expression in response to the stimulus [26,27]. This upregulation resulted in the negative regulation of glycoproteins such as syndecan (SDC) and versican (VCAN) [26]. These glycoproteins are involved in intercellular adhesion, migration, proliferation, and cellular differentiation processes [28].

According to Müller-Deile and colleagues [26], the downregulation of these proteins resulted in alterations in the structure and function of the glomerular filtration barrier, contributing to the development of a nephrotic profile in zebrafish larvae. This nephrotic profile was mainly characterized by the loss of plasma proteins, observed through fluorescence detected in the ocular vessels of Tg(l-fabp:DBP:EGFP) zebrafish under optical microscopy [26]. Additionally, there may also be a paracrine crosstalk between podocytes and other cells of the renal structure, such as Glomerular Endothelial Cells (GECs), through the release of Exosomal Vesicles (EVs) containing miRNAs excreted by podocytes [17].

This type of communication has been previously observed between GECs and other cell types [29]. Another indication of this communication is that the increase in *miR-143* expression in podocytes results in the negative regulation of VCAN and SDC isoforms not

only in podocytes but also in glomerular endothelial cells, since these cells also express isoforms of miR-143 target genes [26], such as SDC1, SDC3, and VCAN, and since these cells are histologically adjacent to podocytes [30], they may be subject to regulation by interference from external EVs. In summary, these data indicate that glomerular glyocalyx proteins (DSC and VCAN) are regulated by miR-143 and that miR-143 may be a novel agent in TGF- β -induced glomerulonephropathy, as its overexpression causes functional and structural impairments in the glomerular filtration barrier [26].

Currently, there is not much information in the global literature regarding miR-143-3p and Diabetic Nephropathy. In a previous study made by Perez-Hernandez et al. [17], individuals with hypertension who also had DKD showed an upregulation of miR-143-3p, particularly in the urine exosome miRNome. In that study, miR-143-3p was one of the miRNAs selected for validation in a confirmatory group of hypertensive patients with and without albuminuria. However, the results showed no significant differences in miR-143-3p expression levels between the groups [16].

Regarding DKD, miR-143-3p may be involved in its pathogenesis, as in a study by Müller-Deile and collaborators, where the overexpression of miR-143 results in a nephrotic phenotype, including generalized edema, loss of plasma proteins, the swelling of glomerular endothelial cells and the loss of glomerular endothelial fenestration. These data indicate a dysfunction in the glomerular filtration barrier [24].

3.3. *hsa-miR-501-3p*

Although significant differences in expression levels between the groups (Non vs. UAE) in our cohort for miR-501-3p were not found, previous studies highlight variations in this miRNA's levels. For example, in the Chinese population, DKD patients in stage V presented a significant downregulation of miR-501-3p when compared with DKD patients in stage I [18]. In *in vitro* cells, the overexpression of miR-501-3p markedly inhibits cellular proliferation, inducing an interruption of the G1 phase [31]. This mechanism happens through the genetic suppression of WTAP, a target gene of miR-501-3p, the data of which were confirmed by other experiments. The WTAP suppression produces inhibitor effects of cellular proliferation [31].

According to the literature, miR-501-3p was identified as differentially expressed (downregulated) in serum samples from patients with Alzheimer's disease [32] and breast cancer cells [33]. Thus, miR-501-3p seems to be intimately involved in cell proliferation [32,33]. Cell proliferation is commonly observed in the early stages of DKD, in which there is an increase in GFR because of an increase of glomerular mass, in response to incentives, such as induction by TGF- β [25]. With its dual behavior in disorders related to cell proliferation, it is not possible to precisely determine whether miR-501-3p acts in a pathogenic or protective manner, as it may be attempting to suppress a pathogenic biological process as well as contributing to the development of this pathology.

3.4. *hsa-miR-100-5p*

Here, we found that hsa-miR-100-5p may be associated with nephropathy protection. Assmann et al. indicate a lower miR-100-5p expression in patients with T1DM without comorbidities [19]. However, we did not identify any suggestions of an involvement of this miRNA in albuminuria in patients with T1DM, so this finding is the first related to the association of this miRNA with Diabetic Nephropathy. This review revealed that miR-100 is significantly downregulated in serum/plasma samples from patients with T1DM [19].

In addition, other authors have identified that, through the interaction with the mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) signaling pathway, this miRNA may be involved in cell growth and proliferation [19,34,35]. mTOR is a crucial protein kinase in regulating cell growth and proliferation, as well as integrating signals from nutrients, energy, and growth factors to coordinate the cellular response. It plays a crucial role in regulating protein biosynthesis, ribosome biogenesis, and protein translation, promoting cell growth. In addition, mTOR plays an important role in regulating mitophagy. Under favorable conditions,

such as high nutrient and energy availability, mTORC1 inhibits mitophagy by suppressing the formation of autosomes surrounding damaged mitochondria for degradation. On the other hand, in situations of cellular stress, such as oxidative stress, the inhibition of mTORC1 allows for the activation of mitophagy to remove dysfunctional mitochondria, suppressing it in favorable conditions and allowing it to maintain cellular homeostasis [36].

Considering our data, and the previous discussion, a reduced expression of miR-100 in patients with MIC was observed when compared to non-UEA. Hence, we hypothesize that the downregulation of miR-100-5p may represent a protective response against the various pathological processes observed in the early stages of DKD, since the underexpression of that miRNA can be a molecular answer to DKD development. Thus, this allows for the normal function of pathways in which target genes act, resulting in a protective cellular mechanism that tries to combat DKD progress. Some modifications produced by DKD are glomerular hypertrophy and mesangial expansion, which are directly related to cell growth and proliferation, which contribute, for example, to the increase of GFR. The increase in the glycation process is another phenomenon observed at the onset of DM which intensifies in kidney cells as DKD progresses. This provokes an increase in Advanced Glycation End-products (AGEs) inside the cells. All these previous processes result, directly or indirectly, in the cell damage and activation of immune and mitochondrial mechanisms [37]. However, further research is needed to elucidate the miR-100 behavior in DKD.

The same was not observed when comparing the mean Δ CT of miR-100-5p between the MIC and Non-UAE groups, where we observed an increase in albuminuria excretion and a decrease in GFR, due to the increase in endothelial fenestral space and mainly renal functional cell death.

3.5. Target Genes

We used miRTargetLink 2.0 [38] to investigate the target genes related to the four miRNAs previously analyzed and selected just the relevant ones. The relevance criteria follow miRTarbase, which considers Reporter assay, Western blot and qPCR as strong validators, and microarray, NGS, pSILAC, CLIP-Seq and other methods as less strong validators [38]. We observed that three genes are linked to both miR-100-5p and miR-143-3p, which are IGF1R, AKT1, and MMP13. Figure 3 and Supplementary Table S1 show this information.

The *IGF1R* gene (Insulin like-Growth Factor Receptor), develops a crucial role in metabolic actions and has autocrine, endocrine, and paracrine functions. It has been shown that IGF1R inhibition can annulate some DKD symptoms, such as albuminuria in mice [34], following previous studies [39]. Moreover, AKT1 is also a target gene that is related to some important pathways, such as insulin resistance, PI3K-Akt signaling, TGF- β signaling, MAPK signaling, the insulin signaling pathway, TNF signaling, and AGE-RAGE signaling in diabetic complications [40]. Finally, MMP13 overexpression can promote renal tubular epithelial cell injury [41], possibly because the MMP, a family of zinc-dependent endoproteases, is generally responsible for some metabolic processes as well, such as apoptosis, angiogenesis, and tissue regeneration [42].

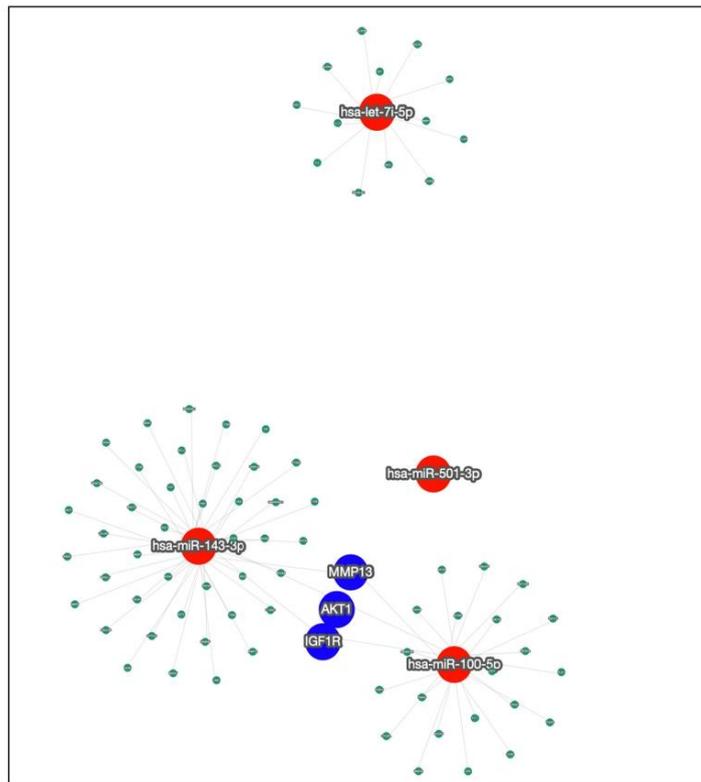


Figure 3. Network association between the four miRNAs and their target genes. The investigated miRNAs are in red and their target genes are in green, except for the three genes in blue, which are the target genes in the intersection of two miRNAs.

4. Materials and Methods

4.1. Sampling and Ethical Aspects

In this research, 20 individuals with diagnosed T1DM were included, according to the criteria from the American Diabetes Association (ADA) [43]. Urinary Albumin Excretion (UAE) over 24 h was used to measure albuminuria in the selected samples. Albuminuria was considered if two out of three consecutive measures were high.

The categories used for classification were UAE not elevated (Non) ($n = 13$) for values up to 30 mg/24 h; microalbuminuria (MIC) ($n = 4$) for values higher than 30 mg/24 h; and macroalbuminuria (MAC) ($n = 3$), for values equal to or higher than 299 mg/24 h. The Research Ethics Committee of the João de Barros Barreto University Hospital (HUJBB, Belém, Pará, Brazil) approved this work (n. 005/12). All procedures involving human participants followed the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki. All participants gave written informed consent.

4.2. Selection of miRNAs

The expression data of hsa-let-7f-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-501-3p, and hsa-miR-100-5p were obtained from the previous study made by Ferraz et al. [15]. These miRNAs

were selected because they had the highest fold change and the lowest *p*-value. The original work used RT-qPCR for validation, following protocols of RNA extraction, quantification, and amplification.

4.3. Data Analysis

The expression levels of the studied miRNAs were normalized using the comparative Ct method [44] and miR-16 was used as an endogenous control. *T*-tests or Mann–Whitney tests were used when comparing two groups if the data were parametric or non-parametric, respectively. If three or more groups were compared, we used ANOVA or Kruskal–Wallis followed by pairwise comparisons adjusted by the false discovery rate (FDR) method. All statistical analyses and graphs were performed using R v.4.0.2 and *p*-values < 0.05 were considered statistically significant.

5. Conclusions

In conclusion, our study highlights the potential role of hsa-miRNA-100-5p in protecting against nephropathy in T1DM, as indicated by its decreased expression in patients with microalbuminuria. While hsa-miR-501-3p and hsa-miR-143-3p have been extensively studied in different conditions, our analysis did not find significant differences in their expression levels between the groups. Our findings also suggest a regulatory role of miRNAs in modulating target genes such as *AKT1*, *MMP13*, and *IGF1R*, implicating them in signaling pathways and cellular metabolism relevant to Diabetic Kidney Disease.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms25115663/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, A.H.G.P. and G.C.C.; methodology, A.H.G.P. and B.d.O.P.; formal analysis, A.H.G.P.; investigation, A.H.G.P. and B.d.O.P.; resources, L.S.D.S., F.T.C.d.M., A.C.C.B.d.S., V.S.G.L., P.B.B.d.F., J.F.A.N., M.C.d.S., N.N.M.d.Q. and K.M.F.; data curation, L.S.D.S., F.T.C.d.M., A.C.C.B.d.S., V.S.G.L., P.B.B.d.F., J.F.A.N., M.C.d.S., N.N.M.d.Q. and K.M.F.; writing—original draft preparation, A.H.G.P., B.d.O.P. and G.C.C.; writing—review and editing, A.H.G.P., B.d.O.P. and G.C.C.; supervision, J.S.F. and G.C.C.; project administration, Á.R.-d.-S., J.S.F. and G.C.C.; funding acquisition, Á.R.-d.-S. and J.S.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil), Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA) and Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Pará (PROPESP/UFPa). This work is part of Rede de Pesquisa em Genômica Populacional Humana (Biocomputacional—Protocol no. 3381/2013/CAPES) and CNPq/MCTI/FNDCT—Processo: 407922/2021-0.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethics Committee of João de Barros Barreto University Hospital (HUIBB, Belém, Pará, Brazil) (protocol n. 005/12).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The original data is available from doi:10.3389/fendo.2022.1033809.

Acknowledgments: The authors thank the Endocrinology and Metabolism/Diabetes Unit of the João de Barros Barreto University Hospital at the Federal University of Pará (HUIBB-UFPa) for providing blood samples. This project was conducted and supported by the Endocrinology and Metabolism/Diabetes Unit in collaboration with the Laboratory of Human and Medical Genetics.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Akil, A.A.-S.; Yassin, E.; Al-Maraghi, A.; Aliyev, E.; Al-Malki, K.; Fakhro, K.A. Diagnosis and Treatment of Type 1 Diabetes at the Dawn of the Personalized Medicine Era. *J. Transl. Med.* **2021**, *19*, 137. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cieżyki, S.; Kurpiewska, E.; Bossowski, A.; Glowńska-Olszewska, B. Multi-Faceted Influence of Obesity on Type 1 Diabetes in Children—From Disease Pathogenesis to Complications. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 890833. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wu, Z.; Xu, X.; Cai, J.; Chen, J.; Huang, L.; Wu, W.; Pugliese, A.; Li, S.; Ricordi, C.; Tan, J. Prevention of Chronic Diabetic Complications in Type 1 Diabetes by Co-Transplantation of Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells and Autologous Bone Marrow: A Pilot Randomized Controlled Open-Label Clinical Study with 8-Year Follow-Up. *Cytotherapy* **2022**, *24*, 421–427. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Samsu, N. Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *BioMed Res. Int.* **2021**, *2021*, 1497449. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sociedade Brasileira de Diabetes. *Diretrizes Da Sociedade Brasileira de Diabetes*; Editora Clannad: São Paulo, Brazil, 2017.
- Mahtal, N.; Lenoir, O.; Tinel, C.; Anglicheau, D.; Tharaux, P.-L. MicroRNAs in Kidney Injury and Disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2022**, *18*, 643–662. [\[CrossRef\]](#)
- Papadopoulou-Marketou, N.; Paschou, S.A.; Marketos, N.; Adamidi, S.; Adamidis, S.; Kanaka-Gantenbein, C. Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes. *Minerva Med.* **2018**, *109*, 218–228. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- American Diabetes Association Professional Practice Committee. 11. Chronic Kidney Disease and Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care* **2022**, *45*, S175–S184. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nascimento, L.R.D.; Domingueti, C.P. MicroRNAs: New Biomarkers and Promising Therapeutic Targets for Diabetic Kidney Disease. *J. Bras. Nefrol.* **2019**, *41*, 412–422. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Porto, J.R.; Gomes, K.B.; Fernandes, A.P.; Domingueti, C.P. Evaluation of Renal Function in Chronic Kidney Disease. *Rev. Bras. Anál. Clin.* **2017**, *49*, 26–35. [\[CrossRef\]](#)
- O'Brien, J.; Hayder, H.; Zayed, Y.; Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 402. [\[CrossRef\]](#)
- Bhatt, K.; Kato, M.; Natarajan, R. Mini-Review: Emerging Roles of microRNAs in the Pathophysiology of Renal Diseases. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **2016**, *310*, F109–F118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tang, J.; Yao, D.; Yan, H.; Chen, X.; Wang, L.; Zhan, H. The Role of MicroRNAs in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *Int. J. Endocrinol.* **2019**, *2019*, 8719060. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Souza, A.M.D.; Resende, S.S.; Sousa, T.N.D.; Brito, C.F.A.D. A Systematic Scoping Review of the Genetic Ancestry of the Brazilian Population. *Genet. Mol. Biol.* **2019**, *42*, 495–508. [\[CrossRef\]](#)
- Ferraz, R.S.; Santos, L.C.B.; da-Silva-Cruz, R.L.; Braga-da-Silva, C.H.; Magalhães, L.; Ribeiro-dos-Santos, A.; Vidal, A.; Vinasco-Sandoval, T.; Reis-das-Mercês, L.; Sena-dos-Santos, C.; et al. Global miRNA Expression Reveals Novel Nuclear and Mitochondrial Interactions in Type 1 Diabetes Mellitus. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 1033809. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Prabu, P.; Rome, S.; Sathishkumar, C.; Gastebois, C.; Meugnier, E.; Mohan, V.; Balasubramanyam, M. MicroRNAs from Urinary Extracellular Vesicles Are Non-Invasive Early Biomarkers of Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetes Patients with the 'Asian Indian Phenotype'. *Diabetes Metab.* **2019**, *45*, 276–285. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Perez-Hernandez, J.; Riffo-Campos, A.L.; Ortega, A.; Martinez-Arroyo, O.; Perez-Gil, D.; Olivares, D.; Solaz, E.; Martinez, F.; Martínez-Hervás, S.; Chaves, F.J.; et al. Urinary- and Plasma-Derived Exosomes Reveal a Distinct MicroRNA Signature Associated With Albuminuria in Hypertension. *Hypertension* **2021**, *77*, 960–971. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Liu, X.; Wang, W.; Bai, Y.; Zhang, H.; Zhang, S.; He, L.; Zhou, W.; Zhang, D.; Xu, J. Identification of a Genome-Wide Serum microRNA Expression Profile as Potential Noninvasive Biomarkers for Chronic Kidney Disease Using next-Generation Sequencing. *J. Int. Med. Res.* **2020**, *48*, 030006052096948. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Assmann, T.S.; Recamonde-Mendoza, M.; De Souza, B.M.; Crispim, D. MicroRNA Expression Profiles and Type 1 Diabetes Mellitus: Systematic Review and Bioinformatic Analysis. *Endocr. Connect.* **2017**, *6*, 773–790. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Yang, S.; Berdine, G. The Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve. *SW Resp. Crit. Care Chron.* **2017**, *5*, 34. [\[CrossRef\]](#)
- Polo, T.C.F.; Miot, H.A. Aplicações Da Curva ROC Em Estudos Clínicos e Experimentais. *J. Vasc. Bras.* **2020**, *19*, e20200186. [\[CrossRef\]](#)
- Komiya, Y.; Habas, R. Wnt Signal Transduction Pathways. *Organogenesis* **2008**, *4*, 68–75. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhou, L.; Liu, Y. Wnt/ β -Catenin Signaling and Podocyte Dysfunction in Proteinuric Kidney Disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2015**, *11*, 535–545. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Goru, S.K.; Kadakol, A.; Gaikwad, A.B. Hidden Targets of Ubiquitin Proteasome System: To Prevent Diabetic Nephropathy. *Pharmacol. Res.* **2017**, *120*, 170–179. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Garud, M.; Kulkarni, Y. Hyperglycemia to Nephropathy via Transforming Growth Factor Beta. *Curr. Diabetes Rev.* **2014**, *10*, 182–189. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Müller-Deile, J.; Gellrich, F.; Schenk, H.; Schroder, P.; Nyström, J.; Lorenzen, J.; Haller, H.; Schiffer, M. Overexpression of TGF- β Inducible microRNA-143 in Zebrafish Leads to Impairment of the Glomerular Filtration Barrier by Targeting Proteoglycans. *Cell Physiol. Biochem.* **2016**, *40*, 819–830. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

27. Tabei, A.; Sakairi, T.; Hamatani, H.; Ohishi, Y.; Watanabe, M.; Nakasatomi, M.; Ikeuchi, H.; Kaneko, Y.; Kopp, J.B.; Hiromura, K. The miR-143/145 Cluster Induced by TGF- β 1 Suppresses Wilms' Tumor 1 Expression in Cultured Human Podocytes. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **2023**, *325*, F121–F133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Czarnowski, D. Syndecans in Cancer: A Review of Function, Expression, Prognostic Value, and Therapeutic Significance. *Cancer Treat. Res. Commun.* **2021**, *27*, 100312. [[CrossRef](#)]
29. Deng, L.; Blanco, F.J.; Stevens, H.; Lu, R.; Caudrillier, A.; McBride, M.; McClure, J.D.; Grant, J.; Thomas, M.; Frid, M.; et al. MicroRNA-143 Activation Regulates Smooth Muscle and Endothelial Cell Crosstalk in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ. Res.* **2015**, *117*, 870–883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Arif, E.; Nihalani, D. Glomerular Filtration Barrier Assembly: An Insight. *Postdoc J.* **2013**, *1*, 33–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. He, L.; Chen, S.; Ying, Y.; Xie, H.; Li, J.; Ma, X.; Wang, W.; Shen, H.; Wang, X.; Zheng, X.; et al. MicroRNA-501-3p Inhibits the Proliferation of Kidney Cancer Cells by Targeting WTAP. *Cancer Med.* **2021**, *10*, 7222–7232. [[CrossRef](#)]
32. Hara, N.; Kikuchi, M.; Miyashita, A.; Hatsuta, H.; Saito, Y.; Kasuga, K.; Murayama, S.; Ikeuchi, T.; Kuwano, R. Serum microRNA miR-501-3p as a Potential Biomarker Related to the Progression of Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol. Commun.* **2017**, *5*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Yin, L.; Ding, Y.; Wang, Y.; Wang, C.; Sun, K.; Wang, L. Identification of Serum miR-501-3p and miR-338-3p as Novel Diagnostic Biomarkers for Breast Cancer and Their Target Genes Associated with Immune Infiltration. *Int. J. Gen. Med.* **2023**, *16*, 1279–1294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Li, B.; Hu, P.; Liu, K.; Xu, W.; Wang, J.; Li, Q.; Chen, B.; Deng, Y.; Han, C.; Sun, T.; et al. MiRNA-100 Ameliorates Diabetes Mellitus-induced Erectile Dysfunction by Modulating Autophagy, Anti-inflammatory, and Antifibrotic Effects. *Andrology* **2024**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wei, J.; Chen, T.; Feng, G. MiR-100-5p Transfected MSCs-Derived Exosomes Can Suppress NSCLC Progression via PI3K-AKT-mTOR. *Oncologie* **2023**, *25*, 705–715. [[CrossRef](#)]
36. Dunlop, E.A.; Tee, A.R. mTOR and Autophagy: A Dynamic Relationship Governed by Nutrients and Energy. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *36*, 121–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Miloudi, K.; Oubaha, M.; Ménard, C.; Dejda, A.; Guber, V.; Cagnone, G.; Wilson, A.M.; Tétreault, N.; Mawambo, G.; Binet, F.; et al. NOTCH1 Signaling Induces Pathological Vascular Permeability in Diabetic Retinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 4538–4547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kern, F.; Aparicio-Puerta, E.; Li, Y.; Fehlmann, T.; Kehl, T.; Wagner, V.; Ray, K.; Ludwig, N.; Lenhof, H.-P.; Meese, E.; et al. miRTargetLink 2.0—Interactive miRNA Target Gene and Target Pathway Networks. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W409–W416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Dong, R.; Yu, J.; Yu, F.; Yang, S.; Qian, Q.; Zha, Y. IGF-1/IGF-1R Blockade Ameliorates Diabetic Kidney Disease through Normalizing Snail1 Expression in a Mouse Model. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **2019**, *317*, E686–E698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Asmy, V.K.S.S.; Natarajan, J. Comparative Co-Expression Analysis of RNA-Seq Transcriptome Revealing Key Genes, miRNA and Transcription Factor in Distinct Metabolic Pathways in Diabetic Nerve, Eye, and Kidney Disease. *Genom. Inform.* **2022**, *20*, e26. [[CrossRef](#)]
41. Li, J.; Dong, R.; Yu, J.; Yi, S.; Da, J.; Yu, F.; Zha, Y. Inhibitor of IGF1 Receptor Alleviates the Inflammation Process in the Diabetic Kidney Mouse Model without Activating SOCS2. *Drug Des. Dev. Ther.* **2018**, *12*, 2887–2896. [[CrossRef](#)]
42. Scheau, C.; Badarau, I.A.; Costache, R.; Caruntu, C.; Mihai, G.L.; Didilescu, A.C.; Constantin, C.; Neagu, M. The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. *Anal. Cell. Pathol.* **2019**, *2019*, 9423907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2015 Abridged for Primary Care Providers. *Am. Diabetes Assoc.* **2015**, *33*, 97–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

5. DISCUSSÃO GERAL

A nefropatia diabética (ND) é uma das principais complicações do diabetes e uma das maiores causas de doença renal crônica em todo o mundo (WU et al., 2022). A falta de ferramentas para o diagnóstico precoce, juntamente com a escassez de tratamentos eficazes, é um dos principais fatores que contribuem para a alta letalidade da nefropatia diabética (ND) (SELBY; TAAL, 2020).

A 25(OH)D, principal tratamento do DM1 atualmente, desempenha um papel essencial nas vias intracelulares relacionadas ao sistema imune, destacando-se por suas ações anti-inflamatórias e na reparação tecidual. Ela induz a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4, promovendo a polarização imunológica para o perfil Th2, que favorece a reparação de tecidos (AO; KIKUTA; ISHII, 2021). Além disso, a forma ativa da 25(OH)D inibe a secreção de moléculas pró-inflamatórias, como TNF-alfa e INF-gama (AO; KIKUTA; ISHII, 2021; BERER et al., 2000; JOSHI et al., 2011). Esses efeitos são particularmente relevantes em condições de nefropatia, onde a inflamação desempenha um papel significativo na progressão da doença.

Em nossos dados, foram observadas melhorias em quatro pacientes após o tratamento: três pacientes que reverteram a albuminúria (Micro para Normo), e um paciente que reduziu a Albuminuria (Macro para Micro). Os 15 pacientes restantes permaneceram com a mesma condição no período da investigação. Na análise de dados qualitativos pareados foi utilizado o teste de McNemar, revelando que essas mudanças não foram estatisticamente significativas ($p=0.6171$). Esses resultados indicam que, apesar dos efeitos benéficos potenciais da 25(OH)D na modulação da resposta inflamatória e na reparação tecidual, esse tratamento não demonstrou uma diferença significativa nas condições dos pacientes, em relação à ND, na amostra estudada.

Em nossa análise de miRNAs circulantes, observamos que hsa-miR-100-5p apresentou uma expressão significativamente menor em pacientes com microalbuminúria (MIC) em comparação àqueles sem albuminúria (Non). No entanto, não foi observada qualquer associação significativa entre os níveis de expressão ao comparar os grupos Non e MAC. Isso sugere que o hsa-miR-100-5p pode ser um biomarcador potencial para o diagnóstico da ND em estágios iniciais, embora sua utilidade em estágios avançados da doença não tenha sido evidenciada (MAC).

Essa observação poderia ser uma particularidade da coorte investigada, limitada pelo reduzido número amostral. No entanto, essa disparidade também pode ser explicada pelo fato de que, mesmo a ND apresentando uma estratificação clínica (SAMSU, 2021), sua progressão não necessariamente segue uma evolução contínua. MIC e a MAC são frequentemente consideradas condições distintas (PASTERNAK et al., 2022). Enquanto muitos pacientes com MAC apresentam previamente MIC, nem todos os pacientes com MIC evoluem para MAC (HWANG et al., 2023; PASTERNAK et al., 2022). Isso sugere que a transição entre esses estágios pode ser influenciada por fatores individuais ainda não esclarecidos. Assim, a hipoxpressão do hsa-miR-100-5p pode indicar uma característica específica dos mecanismos moleculares associados à MIC.

Quando analisamos possíveis genes alvos desse miRNA, os dados sugeriram um papel regulador do hsa-miR-100-5p na modulação de genes como *AKT1*, *MMP13* e *IGF1R*.

O *AKT1* (*AKT serine/threonine kinase 1*) é um gene fundamental na via de sinalização PI3K-AKT, desempenhando um papel crucial em processos celulares como crescimento, sobrevivência e metabolismo (ASMY; NATARAJAN, 2022). A regulação do *AKT1* pelo hsa-miR-100-5p pode influenciar de maneira significativa a resistência à insulina. Esse miRNA também exerce um controle sobre a expressão do *MMP13* (*matrix metalloprotease 13*), que codifica uma metaloproteinase envolvida na degradação dos componentes da matriz extracelular (SCHEAU et al., 2019). A hiperexpressão de *MMP13* pode promover lesão nas células epiteliais tubulares renais (SCHEAU et al., 2019). Ademais, o *IGF1R* (*Insulin-like growth factor 1 receptor*), um receptor crucial para o crescimento e desenvolvimento celular, é também regulado pelo hsa-miR-100-5p. A alteração nos níveis de *IGF1R* pode impactar diretamente a regulação do crescimento celular e a resposta a fatores de crescimento, ajudando a proteger os rins ao reduzir a hiperplasia e a fibrose (LI et al., 2018).

Nossa hipótese é que a regulação negativa de genes associados à resistência à insulina (*AKT1*), lesão nas células epiteliais tubulares renais (*MMP13*) e hiperplasia e fibrose (*IGF1R*) em pacientes sem albuminúria (Non), devido a níveis mais elevados de hsa-miR-100-5p, seria crucial para a manutenção da integridade estrutural do tecido renal. Em contraste, na microalbuminúria (MIC), esses genes estariam expressos devido à hipoxpressão de hsa-miR-100-5p, conforme observado em nosso estudo.

Em nosso grupo de análise não foram detectadas diferenças significativas na expressão do hsa-let-7i-5p circulante, demonstrando um baixo potencial como ferramenta diagnóstica neste fluido corpóreo específico, mas outros autores detectaram um hiperexpressão deste miRNA em vesículas extracelulares na urina de pacientes com albuminúria (MIC e MAC) em comparação com indivíduos sem a condição (PRABU et al., 2019). Isso sugere que assinaturas moleculares distintas estão presentes em diferentes tipos de amostras. Esse grupo de pesquisa também identificou que o miRNA hsa-let-7i-5p, em combinação com miR-15b-5p, miR-24-3p e miR-27b-3p, forma uma assinatura molecular capaz de distinguir de maneira eficaz pacientes Non-UAE de pacientes UAE (MIC/MAC). Essa assinatura apresentou uma AUROC superior a 85%, indicando uma alta capacidade discriminatória (PRABU et al., 2019). Esses achados sugerem que, embora o hsa-let-7i-5p possa não ser um biomarcador eficaz no sangue, ele se revela um promissor biomarcador urinário para albuminúria.

A análise de PRABU et al. (2019) ainda revelou três redes proteicas associadas aos miRNAs estudados: a via Wnt/ β -catenina, a sinalização do receptor activina e a regulação da diferenciação e proliferação celular. Essas vias são fundamentais para processos celulares e estão relacionadas a distúrbios renais, como a doença renal diabética (DRD) e a fibrose renal. A desregulação dessas vias contribui significativamente para a progressão de doenças renais, destacando a importância do hsa-let-7i-5p na fisiopatologia da DRD.

De forma semelhante, em nosso grupo de pacientes, não houve diferença significativa na expressão do miR-143-3p circulante, sugerindo que este miRNA não é um bom marcador circulante. No entanto, outro estudo identificou que o miR-143-3p estava hiperregulado em exossomos urinários de pacientes com doença renal crônica (DRC) induzida por hipertensão arterial (PEREZ-HERNANDEZ et al., 2021). Além disso, em estudos com podócitos, a estimulação por TGF- β resultou em um aumento da expressão do miR-143-3p, o que foi associado à regulação negativa de glicoproteínas essenciais como sindecana (SDC) e versican (VCAN), importantes para a função da barreira de filtração glomerular e processos celulares como adesão e proliferação (MÜLLER-DEILE et al., 2016).

Em modelos de *zebrafish*, a regulação negativa de SDC e VCAN causada pela superexpressão de miR-143-3p levou a alterações na estrutura e função da barreira de filtração glomerular, resultando em um perfil nefrótico, caracterizado pela perda de

proteínas plasmáticas e disfunção glomerular (GORU; KADAKOL; GAIKWAD, 2017; MÜLLER-DEILE et al., 2016).

Além disso, o miR-143-3p também pode exercer um efeito parácrino, influenciando tanto os podócitos quanto as células endoteliais glomerulares através da liberação de exossomos contendo esse miRNA. Essa interação pode afetar a função das células endoteliais glomerulares, que expressam os alvos deste miRNA, destacando seu papel na patologia renal (DENG et al., 2015; MÜLLER-DEILE et al., 2016).

Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas nos níveis de expressão do miR-501-3p entre os grupos investigados, estudos anteriores destacam variações nos níveis desse miRNA. Por exemplo, em uma população chinesa, pacientes com DRD em estágio V apresentaram uma regulação negativa significativa do miR-501-3p em comparação com pacientes em estágio I (LIU et al., 2020). Em células *in vitro*, a superexpressão de miR-501-3p inibe marcadamente a proliferação celular, interrompendo a fase G1, por meio da supressão do gene *WTAP*, alvo do miR-501-3p. A supressão de *WTAP* gera efeitos inibidores na proliferação celular (HARA et al., 2017), e esse pode ser um dos mecanismos pelos quais esse miRNA atua na DRD.

Além disso, a literatura identifica o miR-501-3p como diferencialmente expresso (regulado negativamente) em amostras séricas de pacientes com Doença de Alzheimer e em células de câncer de mama (HARA et al., 2017; YIN et al., 2023). Esse fenômeno de proliferação celular é comum nos estágios iniciais da DRD, caracterizados pelo aumento da taxa de filtração glomerular (GFR) e da massa glomerular em resposta a estímulos como a indução por TGF- β (GARUD; KULKARNI, 2014). Estes achados sugerem um forte envolvimento do miR-501-3p em doenças relacionadas à proliferação celular.

6. CONCLUSÃO

Nossas análises revelaram que, apesar das expectativas de que a vitamina D pudesse promover uma melhora na condição dos pacientes, os resultados clínicos de ND não demonstraram uma diferença estatisticamente significativa, sugerindo que, no contexto da nossa amostra, a vitamina D não teve um efeito substancial na progressão ou estabilização da ND. Este resultado ressalta a necessidade de considerar variáveis adicionais que podem impactar a eficácia do tratamento, como a heterogeneidade da amostra, incluindo duração de DM1 e metabolismo individual.

A análise de interação dos miRNAs com seus genes alvos forneceu informações sobre suas possíveis funções em processos biológicos relacionados à nefropatia diabética. Nossos achados sugerem que o hsa-miR-100-5p pode ser um potencial biomarcador para diagnóstico precoce da ND, especialmente em seus estágios iniciais. A regulação de genes como *AKT1*, *MMP13* e *IGF1R*, envolvidos em resistência à insulina, degradação da matriz extracelular e hiperplasia, pode indicar um papel do hsa-miR-100-5p na modulação desses mecanismos. Além disso, ressalta-se a relevância de investigar diferentes tipos de amostras, como sangue e urina, para compreender melhor as assinaturas moleculares associadas à nefropatia diabética.

Os dados obtidos neste estudo reforçam a complexa relação entre diferentes fatores moleculares na nefropatia diabética. A identificação de redes de interação entre miRNAs e genes associados à ND contribui para uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na doença, o que possibilita o desenvolvimento de melhores intervenções terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A. A.; DRAVES, S. O.; ROSCA, M. Mitochondria in Diabetic Kidney Disease. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 2945, 29 out. 2021.

AKIL, A. A.-S. et al. Diagnosis and treatment of type 1 diabetes at the dawn of the personalized medicine era. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, n. 1, p. 137, 1 abr. 2021.

AKIL, A.-S. A.-S. et al. Reading between the (Genetic) Lines: How Epigenetics is Unlocking Novel Therapies for Type 1 Diabetes. **Cells**, v. 9, n. 11, p. 2403, 3 nov. 2020.

AO, T.; KIKUTA, J.; ISHII, M. The Effects of Vitamin D on Immune System and Inflammatory Diseases. **Biomolecules**, v. 11, n. 11, p. 1624, 3 nov. 2021.

ASMY, V. K. S. S.; NATARAJAN, J. Comparative co-expression analysis of RNA-Seq transcriptome revealing key genes, miRNA and transcription factor in distinct metabolic pathways in diabetic nerve, eye, and kidney disease. **Genomics & Informatics**, v. 20, n. 3, p. e26, 30 set. 2022.

BARRETT, E. J. et al. Diabetic Microvascular Disease: An Endocrine Society Scientific Statement. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 102, n. 12, p. 4343–4410, 1 dez. 2017.

BARUTTA, F. et al. Association of serum MicroRNA-145-5p levels with microvascular complications of type 1 Diabetes: The EURODIAB prospective complications study. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 190, p. 109987, ago. 2022.

BERER, A. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro. **Experimental Hematology**, v. 28, n. 5, p. 575–583, maio 2000.

BHATT, K.; KATO, M.; NATARAJAN, R. Mini-review: emerging roles of microRNAs in the pathophysiology of renal diseases. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 310, n. 2, p. F109–F118, 15 jan. 2016.

BURRACK, A. L.; MARTINOV, T.; FIFE, B. T. T Cell-Mediated Beta Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, p. 343, 5 dez. 2017.

CERNEA, S.; DOBREANU, M.; RAZ, I. Prevention of type 1 diabetes: today and tomorrow. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 26, n. 8, p. 602–605, nov. 2010.

CIEŹKI, S. et al. Multi-Faceted Influence of Obesity on Type 1 Diabetes in Children – From Disease Pathogenesis to Complications. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 890833, 16 jun. 2022.

DENG, L. et al. MicroRNA-143 Activation Regulates Smooth Muscle and Endothelial Cell Crosstalk in Pulmonary Arterial Hypertension. **Circulation Research**, v. 117, n. 10, p. 870–883, 23 out. 2015.

EREKAT, N. S. Programmed Cell Death in Diabetic Nephropathy: A Review of Apoptosis, Autophagy, and Necroptosis. **Medical Science Monitor**, v. 28, 10 ago. 2022.

FERRAZ, R. S. et al. Variants in the VDR Gene May Influence 25(OH)D Levels in Type 1 Diabetes Mellitus in a Brazilian Population. **Nutrients**, v. 14, n. 5, p. 1010, 27 fev. 2022a.

FERRAZ, R. S. et al. Global miRNA expression reveals novel nuclear and mitochondrial interactions in Type 1 diabetes mellitus. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 1033809, 24 nov. 2022b.

GARUD, M.; KULKARNI, Y. Hyperglycemia to Nephropathy via Transforming Growth Factor Beta. **Current Diabetes Reviews**, v. 10, n. 3, p. 182–189, 5 jun. 2014.

GOODWIN, G. Type 1 Diabetes Mellitus and Celiac Disease: Distinct Autoimmune Disorders That Share Common Pathogenic Mechanisms. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 92, n. 5, p. 285–292, 2019.

GOOTJES, C. et al. Functional Impact of Risk Gene Variants on the Autoimmune Responses in Type 1 Diabetes. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 886736, 4 maio 2022.

GORU, S. K.; KADAKOL, A.; GAIKWAD, A. B. Hidden targets of ubiquitin proteasome system: To prevent diabetic nephropathy. **Pharmacological Research**, v. 120, p. 170–179, jun. 2017.

GUAY, C.; REGAZZI, R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 9, p. 513–521, set. 2013.

HARA, N. et al. Serum microRNA miR-501-3p as a potential biomarker related to the progression of Alzheimer's disease. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 5, n. 1, p. 10, dez. 2017.

HE, X. et al. Epigenetic modifications in radiation-induced non-targeted effects and their clinical significance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1867, n. 8, p. 130386, ago. 2023.

HOLT, R. I. G. et al. Correction to: The management of type 1 diabetes in adults. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). **Diabetologia**, v. 65, n. 1, p. 255–255, jan. 2022.

HUANG, B.; WEN, W.; YE, S. Correlation Between Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels in Albuminuria Progression of Diabetic Kidney Disease and Underlying Mechanisms By Bioinformatics Analysis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 880930, 12 maio 2022.

HUBER, A. et al. Joint Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes and Autoimmune Thyroiditis: from Epidemiology to Mechanisms. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 6, p. 697–725, 1 out. 2008.

HWANG, S. et al. Prognostic significance of albuminuria in elderly of various ages with diabetes. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 7079, 1 maio 2023.

IBGE. **Tábuas completas de mortalidade em ano de pandemia de COVID-19**. Rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=2101981>>.

INFANTE, M. et al. Influence of Vitamin D on Islet Autoimmunity and Beta-Cell Function in Type 1 Diabetes. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2185, 11 set. 2019.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Type 1 diabetes numbers in children and adults**. Belgium: International Diabetes Federation, 2021. Disponível em: <<https://www.diabetesatlas.org>>.

JERRAM, S. T.; DANG, M. N.; LESLIE, R. D. The Role of Epigenetics in Type 1 Diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 17, n. 10, p. 89, out. 2017.

JIANG, X.; KIEL, D. P.; KRAFT, P. The genetics of vitamin D. **Bone**, v. 126, p. 59–77, set. 2019.

JOSHI, S. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Ameliorates Th17 Autoimmunity via Transcriptional Modulation of Interleukin-17A. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 17, p. 3653–3669, 1 set. 2011.

KHAN, R. et al. From Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research. **Medicina**, v. 55, n. 9, p. 546, 29 ago. 2019.

KIM, S.-S. et al. A comprehensive integrated post-GWAS analysis of Type 1 diabetes reveals enhancer-based immune dysregulation. **PLOS ONE**, v. 16, n. 9, p. e0257265, 16 set. 2021.

LI, J. et al. Inhibitor of IGF1 receptor alleviates the inflammation process in the diabetic kidney mouse model without activating SOCS2. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 12, p. 2887–2896, set. 2018.

LI, Y. et al. PTEN-induced partial epithelial-mesenchymal transition drives diabetic kidney disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 3, p. 1129–1151, 11 fev. 2019.

LIU, X. et al. Identification of a genome-wide serum microRNA expression profile as potential noninvasive biomarkers for chronic kidney disease using next-generation sequencing. **Journal of International Medical Research**, v. 48, n. 12, p. 030006052096948, dez. 2020.

LUCIER, J.; WEINSTOCK, R. S. Type 1 Diabetes. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

MAGLIANO, D.; BOYKO, E. J. **IDF diabetes atlas**. 10th edition ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2021.

MAHTAL, N. et al. MicroRNAs in kidney injury and disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 18, p. 643–662, out. 2022.

MANOUSAKI, D. et al. Vitamin D levels and risk of type 1 diabetes: A Mendelian randomization study. **PLOS Medicine**, v. 18, n. 2, p. e1003536, 25 fev. 2021.

MARTÍN-PELÁEZ, S.; FITO, M.; CASTANER, O. Mediterranean Diet Effects on Type 2 Diabetes Prevention, Disease Progression, and Related Mechanisms. A Review. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 2236, 27 jul. 2020.

MASTROTOTARO, L.; RODEN, M. Insulin resistance and insulin sensitizing agents. **Metabolism**, v. 125, p. 154892, dez. 2021.

MATTICK, J. S. et al. Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 24, n. 6, p. 430–447, jun. 2023.

MILOUDI, K. et al. NOTCH1 signaling induces pathological vascular permeability in diabetic retinopathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 10, p. 4538–4547, 5 mar. 2019.

MIMA, A. Mitochondria-targeted drugs for diabetic kidney disease. **Heliyon**, v. 8, n. 2, p. e08878, fev. 2022.

MÜLLER-DEILE, J. et al. Overexpression of TGF- β Inducible microRNA-143 in Zebrafish Leads to Impairment of the Glomerular Filtration Barrier by Targeting Proteoglycans. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 819–830, 2016.

NAJJAR, L. et al. Vitamin D and Type 1 Diabetes Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis of Genetic Evidence. **Nutrients**, v. 13, n. 12, p. 4260, 26 nov. 2021.

NASCIMENTO, L. R. D.; DOMINGUETI, C. P. MicroRNAs: new biomarkers and promising therapeutic targets for diabetic kidney disease. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 41, n. 3, p. 412–422, set. 2019.

O'BRIEN, J. et al. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 402, 3 ago. 2018.

OGROTIS, I.; KOUFAKIS, T.; KOTSA, K. Changes in the Global Epidemiology of Type 1 Diabetes in an Evolving Landscape of Environmental Factors: Causes, Challenges, and Opportunities. **Medicina**, v. 59, n. 4, p. 668, 28 mar. 2023.

OLSSON, A. H. et al. Genome-Wide Associations between Genetic and Epigenetic Variation Influence mRNA Expression and Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 11, p. e1004735, 6 nov. 2014.

PANG, H. et al. The missing heritability in type 1 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 24, n. 10, p. 1901–1911, out. 2022.

PAPACHRISTOU, S.; PAFILI, K.; PAPANAS, N. Skin AGEs and diabetic neuropathy. **BMC Endocrine Disorders**, v. 21, n. 1, p. 28, dez. 2021.

PAPADOPOULOU-MARKETOU, N. et al. Diabetic nephropathy in type 1 diabetes. **Minerva Medica**, v. 109, n. 3, maio 2018.

PASCHOU, S. A. et al. On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. **Endocrine Connections**, v. 7, n. 1, p. R38–R46, jan. 2018.

PASTERNAK, M. et al. Association of Albuminuria and Regression of Chronic Kidney Disease in Adults With Newly Diagnosed Moderate to Severe Chronic Kidney Disease. **JAMA Network Open**, v. 5, n. 8, p. e2225821, 9 ago. 2022.

PEREZ-HERNANDEZ, J. et al. Urinary- and Plasma-Derived Exosomes Reveal a Distinct MicroRNA Signature Associated With Albuminuria in Hypertension. **Hypertension**, v. 77, n. 3, p. 960–971, 3 mar. 2021.

PIKE, J. W.; CHRISTAKOS, S. Biology and Mechanisms of Action of the Vitamin D Hormone. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 46, n. 4, p. 815–843, dez. 2017.

PRABU, P. et al. MicroRNAs from urinary extracellular vesicles are non-invasive early biomarkers of diabetic nephropathy in type 2 diabetes patients with the ‘Asian Indian phenotype’. **Diabetes & Metabolism**, v. 45, n. 3, p. 276–285, jun. 2019.

REIS, R. C. P. et al. Evolution of diabetes in Brazil: prevalence data from the 2013 and 2019 Brazilian National Health Survey. *Cad Saúde Pública* 2022; 38 Suppl 1:e00149321. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 38, n. 8, p. eER149321, 2022.

SAMSU, N. Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 1–17, 8 jul. 2021.

SCHEAU, C. et al. The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2019, p. 1–10, 26 nov. 2019.

SELBY, N. M.; TAAL, M. W. An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 22, n. S1, p. 3–15, abr. 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **DIABETES**. Disponível em: <<https://diabetes.org.br/>>. Acesso em: 1 ago. 2023.

Standards of Medical Care in Diabetes—2015 Abridged for Primary Care Providers. **American Diabetes Association**, v. 33, n. 2, p. 97–111, 1 abr. 2015.

WANG, Y.; ZHU, J.; DELUCA, H. F. Where is the vitamin D receptor? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, n. 1, p. 123–133, jul. 2012.

WARSHAUER, J. T. et al. A human mutation in STAT3 promotes type 1 diabetes through a defect in CD8+ T cell tolerance. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 8, p. e20210759, 2 ago. 2021.

WATSON, C. N.; BELLI, A.; DI PIETRO, V. Small Non-coding RNAs: New Class of Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Neurodegenerative Disease. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 364, 26 abr. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global report on diabetes**. Geneva: World Health Organization, 2016.

WU, Y. et al. Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n. 11, p. 1185–1200, 2014.

WU, Z. et al. Prevention of chronic diabetic complications in type 1 diabetes by co-transplantation of umbilical cord mesenchymal stromal cells and autologous bone marrow: a pilot randomized controlled open-label clinical study with 8-year follow-up. **Cytotherapy**, v. 24, n. 4, p. 421–427, abr. 2022.

YANG, J.; LIU, Z. Mechanistic Pathogenesis of Endothelial Dysfunction in Diabetic Nephropathy and Retinopathy. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 816400, 25 maio 2022.

YE, J. et al. Identification of loci where DNA methylation potentially mediates genetic risk of type 1 diabetes. **Journal of Autoimmunity**, v. 93, p. 66–75, set. 2018.

YIN, L. et al. Identification of Serum miR-501-3p and miR-338-3p as Novel Diagnostic Biomarkers for Breast Cancer and Their Target Genes Associated with Immune Infiltration. **International Journal of General Medicine**, v. Volume 16, p. 1279–1294, abr. 2023.

YUAN, S.; MERINO, J.; LARSSON, S. C. Causal factors underlying diabetes risk informed by Mendelian randomisation analysis: evidence, opportunities and challenges. **Diabetologia**, v. 66, n. 5, p. 800–812, maio 2023.

ZHANG, A. et al. Role of VEGF-A and LRG1 in Abnormal Angiogenesis Associated With Diabetic Nephropathy. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 1064, 31 ago. 2020.

ZHU, Z. et al. Role of microRNAs in the treatment of type 2 diabetes mellitus with Roux-en-Y gastric bypass. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 3, p. e5817, 2017.

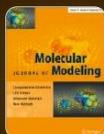
ANEXOS

[Home](#) > [Journal of Molecular Modeling](#) > [Article](#)

Virtual screening and repurposing of approved drugs targeting homoserine dehydrogenase from *Paracoccidioides brasiliensis*

| Original Paper | Published: 03 November 2022

| Volume 28, article number 374, (2022) [Cite this article](#)



[Journal of Molecular Modeling](#)

[Aims and scope](#) →

[Submit manuscript](#) →

[Eliete Costa da Cruz](#) , [Marcos Jessé Abrahão Silva](#), [Geovanna Carla Bandeira Gama](#), [Andrey Henrique Gama Pinheiro](#), [Evonnildo Costa Gonçalves](#) & [Andrei Santos Siqueira](#)

 326 Accesses  1 Altmetric [Explore all metrics](#) →



A molecular survey of three tick-borne pathogens in dogs from Algodual village/Maiandeuá island on the northeast coast of Pará, Brazil

Maridelzira Betânia Moraes David¹, Marcela dos Santos Castro², Andrey Henrique Gama Pinheiro³, Ricardo Luis Sousa Santana⁴, Elaine Lopes de Carvalho⁵, Evonnildo Costa Gonçalves⁶, Elane Guerreiro Giese^{7*}

¹Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Instituto de Saúde e Produção Animal da Amazônia,

Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém, PA, Brasil, <https://orcid.org/0000-0002-1441-885X>

²Laboratório de Tecnologia Biomolecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém 66075-110, Brasil, <https://orcid.org/0000-0002-3405-5005>

³Laboratório de Tecnologia Biomolecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém 66075-110, Brasil, <https://orcid.org/0000-0002-4972-980X>

⁴Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Instituto de Saúde e Produção Animal da Amazônia,

Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém, PA, Brasil, <https://orcid.org/0000-0001-6219-1437>

⁵Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Instituto de Saúde e Produção Animal da Amazônia,

Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém, PA, Brasil, <https://orcid.org/0000-0003-4177-9498>

⁶Laboratório de Tecnologia Biomolecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém 66075-110, Brasil,

<https://orcid.org/0000-0003-2221-1995>

⁷Laboratório de Histologia e Embriologia Animal, Instituto de Saúde e Produção Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém, PA, Brasil, <https://orcid.org/0000-0001-7833-1334>

Submitted: 19/05/23

Accepted: 11/07/23

* Corresponding author: Elane Guerreiro Giese. E-mail: lheaufra@gmail.com

Abstract: *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. and *Babesia* spp. are obligate intracellular parasitic microorganisms found in the blood of domestic animals. Until then, there were no reports of these hemoparasites in dogs in the northeast of the State of Pará. The aim of this study was to record cases of natural infection by *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp. and *Babesia* sp. in dogs from Ilha de Algodual/ Maiandeuá, State of Pará, Brazil, through the detection of DNA from these agents. Whole blood samples were collected from 52 animals, without considering breed, sex or age. Include results for different species of animals and parasites. Molecular analysis data showed 50% co-infection for *Ehrlichia* sp. and *Anaplasma* sp. This study allowed the detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in domestic dogs on Algodual Island, an important ecological tourism site in northern Brazil.

Keywords: hemoparasites; mammals; Brazilian amazon; zoonosis; PCR

1. Introduction

Vector-Borne Diseases (VBDs) are illnesses caused by viruses, bacteria, spirochetes, rickettsia, and parasites which are transmitted between humans, or from animals to humans through blood-feeding arthropod vectors. Since clinical manifestations can vary from no visible symptoms to severe and possibly deadly conditions, VBDs play an important role in veterinary medicine because they affect both pets and economically valuable livestock, and they are a growing public health concern due to their zoonotic potential (Savi et al., 2014; Chala et al., 2021).

Ticks are the second most common agents of VBDs, as they are hematophagous arthropods distributed worldwide, which is due to their ability to adapt to various hosts, environments, and climates (Dantas-Torres et al. 2012). In recent decades, ticks and tick-borne diseases have experienced geographic range shifts, resulting in changing rates of tick exposure and the spread of tick-borne zoonoses as Lyme disease, babesiosis, ehrlichiosis, anaplasmosis, and tularemia, which have a significant impact on public health (Araújo et al., 2015; Kilpatrick et al., 2017). Although there are hundreds of tick species found around the world, not all are known to be disease vectors, and the epidemiological importance of a given species is related to its geographic distribution. *Ixodes* (2 species), *Dermacentor* (2), *Amblyomma* (2), and *Rhipicephalus* (1) are the most common disease-transmitting ticks in the United States (Choi et al., 2016; Pace and O'Reilly, 2020). According to Zhao et al. (2021), in China, the most widely distributed tick genus is *Dermacentor* (574 counties), followed by *Haemaphysalis* (570), *Ixodes* (432), *Rhipicephalus* (431), *Hyalomma* (298), *Argas* (90), *Ornithodoros* (38), *Amblyomma* (37), and *Anomalohimalaya* (5). Brazilian ticks include 70 species, 47 in the family Ixodidae and 23 in the family Argasidae. The genera *Amblyomma* (32 species) and *Ornithodoros* (18) are the most representative (Dantas-Torres et al., 2019). Another vector species of great importance is *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, a cosmopolitan tick found throughout Brazil (Caetano 2016; Labruna and Pereira, 2001). It has a predilection for domestic dogs and is the vector of a series of pathogens that can infect dogs and humans, causing diseases such as ehrlichiosis, anaplasmosis, and babesiosis (Groves et al., 1975; Greene and Harvey 1990; Nava et al., 2017).

In the context of public health, VBDs represent a challenge, as they require the implementation of control and prevention strategies, both to protect health of animals and to prevent transmission of these diseases to humans. Regarding to animal health, identifying agents of VBDs is an essential instrument for veterinarians in deciding the appropriate measures for treatment and prevention (Pinto et al., 2018). Since there is no research data available, in this study we performed a molecular

<http://dx.doi.org/10.5380/avs.v28i2.91206>

1



RESEARCH

Open Access



Whole mitogenome sequencing uncovers a relation between mitochondrial heteroplasmy and leprosy severity

Felipe Gouvea de Souza¹, Moisés Batista da Silva², Gilderlanio S. de Araújo¹, Caio S. Silva¹, Andrey Henrique Gama Pinheiro¹, Miguel Ángel Cáceres-Durán¹, Mayara Natália Santana-da-Silva¹, Pablo Pinto¹, Angélica Rita Gobbo², Patrícia Fagundes da Costa², Claudio Guedes Salgado², Andrea Ribeiro-dos-Santos^{1*} and Giovanna C. Cavalcante^{1*}

Abstract

Background In recent years, the mitochondria/immune system interaction has been proposed, so that variants of mitochondrial genome and levels of heteroplasmy might deregulate important metabolic processes in fighting infections, such as leprosy.

Methods We sequenced the whole mitochondrial genome to investigate variants and heteroplasmy levels, considering patients with different clinical forms of leprosy and household contacts. After sequencing, a specific pipeline was used for preparation and bioinformatics analysis to select heteroplasmic variants.

Results We found 116 variants in at least two of the subtypes of the case group (Borderline Tuberculoid, Borderline Lepromatous, Lepromatous), suggesting a possible clinical significance to these variants. Notably, 15 variants were exclusively found in these three clinical forms, of which five variants stand out for being missense (m.3791T > C in *MT-ND1*, m.5317C > A in *MT-ND2*, m.8545G > A in *MT-ATP8*, m.9044T > C in *MT-ATP6* and m.15837T > C in *MT-CYB*). In addition, we found 26 variants shared only by leprosy poles, of which two are characterized as missense (m.4248T > C in *MT-ND1* and m.8027G > A in *MT-CO2*).

Conclusion We found a significant number of variants and heteroplasmy levels in the leprosy patients from our cohort, as well as six genes that may influence leprosy susceptibility, suggesting for the first time that the mitogenome might be involved with the leprosy process, distinction of clinical forms and severity. Thus, future studies are needed to help understand the genetic consequences of these variants.

Keywords Leprosy, mtDNA, Haplogroups, *Mycobacterium leprae*, Mitogenome

*Correspondence:
Andrea Ribeiro-dos-Santos
akelyufpa@gmail.com
Giovanna C. Cavalcante
giovannacavalcante@gmail.com

¹ Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA 66075-110, Brazil
² Laboratório de Dermatologia-Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Marituba, PA 67105-290, Brazil

Background

Mitochondria are cytoplasmic organelles that participate in several processes in cellular functioning in humans, including different types of cell death, control of calcium levels, regulation of the immune system, metabolic cell signaling and generation of cellular energy in the form of Adenosine Triphosphate (ATP) by tricarboxylic acid (TCA) cycle and oxidative phosphorylation (OXPHOS) [1–3].



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.



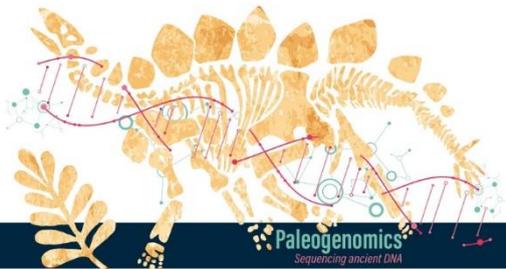
3rd International Meeting on Oncology Research

CERTIFICADO

A COMISSÃO AVALIADORA CONCEDE A **ANDREY HENRIQUE GAMA PINHEIRO** O **PRÊMIO DE 3º MELHOR TRABALHO** NA CATEGORIA PÓS-GRADUAÇÃO, INTITULADO **"MITOPHAGY-RELATED GENES MIGHT PLAY A ROLE IN CUTANEOUS MELANOMA AGGRESSIVENESS"**, AUTORIA DE **ANDREY HENRIQUE GAMA PINHEIRO, GIOVANNA C. CAVALCANTE**, APRESENTADO DURANTE O **3RD INTERNATIONAL MEETING ON ONCOLOGY RESEARCH**, REALIZADO NOS DIAS 28, 29 E 30 DE NOVEMBRO DE 2022, EM BELÉM (PA).

Profª Drª Andrea Ribeiro-dos-Santos

Profº Drº Paulo Assumpção



GENÉTICA²³

68th Brazilian Congress of Genetics

12 a 15 | setembro | 2023 | Centro de Convenções UFOP | Ouro Preto | MG

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado -- **ANALYSIS OF THE MUTATION PROFILE IN DIFFERENT LEVELS OF CELLULARITY IN PANCREATIC CANCER** de autoria de **Andrey Henrique Gama Pinheiro; Giovanna Chaves Cavalcante**, foi apresentado na sessão de **Pôsteres** durante o **68th Brazilian Congress of Genetics**, evento realizado de 12 a 15 de setembro de 2023, na cidade de Ouro Preto - MG.

Célia Maria de Almeida Soares
Presidente da SBG

SBG SOCIEDADE
BRASILEIRA
DE GENÉTICA

Ana Maria Benke Assopon
Primeira Secretária da SBG