

# Análise da expressão do mRNA da proteína S100 $\beta$ em adipócitos de pacientes com diabetes melito tipo 2

*Analysis of the mRNA expression of the S100 $\beta$  protein in adipocytes of patients with diabetes mellitus, type 2*

Mike Yoshio Hamasaki<sup>1</sup>, Mario Hiroyuki Hirata<sup>2</sup>, Rosario Dominguez Crespo Hirata<sup>2</sup>, Silvia Tchernin Himelfarb<sup>2</sup>, Leila Maria Guissoni Campos<sup>1</sup>, Maria Inês Nogueira<sup>1</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** O presente trabalho objetiva compreender a possível relação do nível de expressão gênica do mRNA da proteína S100 $\beta$  em adipócitos com o diabetes melito do tipo 2, pela comparação de dados de portadores dessa doença com os de indivíduos normoglicêmicos. **Materiais e métodos:** Foram selecionadas amostras de tecido adiposo de oito pacientes da Seção de Coronárias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), sendo quatro do grupo diabetes e quatro do grupo de normoglicêmicos. Essas amostras foram submetidas à técnica de RT-PCR em tempo real. **Resultados:** Por meio do *Test-t de Student* para os valores de diferença entre os ciclos threshold ( $\Delta$ Ct), observou-se que houve aumento de aproximadamente 15 vezes ( $p = 0,015$ ) da expressão do mRNA da proteína S100 $\beta$  nos adipócitos dos indivíduos do grupo diabetes quando comparado aos do grupo controle. **Conclusão:** Nossos resultados evidenciam, de forma inédita, coexistência entre o aumento da expressão do gene S100 $\beta$  e a patologia do diabetes melito do tipo 2. Arq Bras Endocrinol Metab. 2012;56(7):435-40

## Descritores

Diabetes; S100beta; RT-PCR; adipócitos; biomarcador

## ABSTRACT

**Objective:** This study aims to explore the possible relationship between the expression level of S100 $\beta$  protein mRNA with *diabetes mellitus* type 2 in adipocytes from patients with this disease in comparison with normoglycemic individuals. **Materials and methods:** Samples of adipose tissue of eight patients from the coronary section of the Institute Dante Pazzanese of Cardiology (IDPC), four in Group Diabetes and four of Normoglycemic group, were evaluated by RT-PCR real time. **Results:** An increase around 15 times values, between the threshold cycle ( $\Delta$ Ct), of mRNA expression of S100 $\beta$  protein in adipocytes of the diabetes group was observed in comparison to the control group ( $p = 0.015$ ). **Conclusion:** Our results indicate, for the first time, that there is coexistence of increased expression of the S100 $\beta$  and the type 2 *diabetes mellitus* gene. Arq Bras Endocrinol Metab. 2012;56(7):435-40

## Keywords

Diabetes; S100beta; RT-PCR; adipocytes; biomarker

<sup>1</sup> Laboratório de Neurociências, Instituto de Ciências Biomédicas III (ICBIII), Departamento de Anatomia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, SP, Brasil

## Correspondência para:

Maria Inês Nogueira  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415  
05508-900 – Cidade Universitária  
São Paulo, SP, Brasil  
minog@usp.br

Recebido em 7/Jun/2011  
Aceito em 30/Ago/2012

## INTRODUÇÃO

O termo diabetes melito (DM) engloba um grupo de doenças metabólicas de etiologia múltipla, caracterizado por hiperglicemia crônica com alterações no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, em função da deficiente ação da insulina nos tecidos

alvos, em consequência de alterações na secreção e/ou ação da insulina (1).

De acordo com dados referidos no “Dossiê de Diabetes – Programa de Controle da Diabetes Mellitos – 1998”, da Direção Geral de Saúde e Sociedade Portuguesa de Diabetologia, “a DM constitui grave

problema de saúde pública em nível mundial não só pela crescente incidência, mas também por sua elevada morbidade e mortalidade”. Estimativas da Organização Mundial da Saúde indicam que cerca de 366 milhões de indivíduos serão afetados pela doença em 2030 (2).

O diabetes melito do tipo 2 (DM2) é o mais comum entre todos os outros tipos, perfazendo cerca de 90% dos casos de diabetes (3). Entre os mecanismos fisiopatológicos da DM2, as alterações teciduais estão relacionadas a um processo de gênese de produtos de glicação avançada (AGEs). Por meio da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares, os AGEs promovem, respectivamente, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (4).

Desde as primeiras pesquisas sobre AGEs *in vivo*, especulou-se sobre a possível existência de sistema de receptores ou proteínas ligantes para AGEs. Atualmente já se conhece um grande número deles, sendo o receptor para produtos finais da glicação avançada (RAGE) o mais descrito, por demonstrar desempenho importante no mecanismo patogênico de diversas doenças (5,6). Consequentemente há crescente relato da interação dos RAGEs com a proteína S100 $\beta$  na ação de muitas patologias, principalmente do sistema nervoso (7-10).

A proteína S100 $\beta$  pertence à família de proteínas ligantes de cálcio. Em espaços intracelulares, essa proteína regula a fosforilação de proteínas, atua na dinâmica dos constituintes do citoesqueleto, fatores de transcrição, crescimento e diferenciação celular, homeostase do cálcio, atividade enzimática e respostas inflamatórias (11-13).

A literatura não identifica mecanismo específico para a ativação e o aumento da expressão dessa proteína uma vez que foi encontrada uma variedade de sinais que podem ativar seu processo de expressão gênica, entre eles estão o interferon gama (14), o fator de crescimento do fibroblasto 2 (15), as interleucinas (16), o glutamato (17), a corticoesterona (18) e a pregnisona (19).

Contudo, atualmente em condições normais, essa proteína já foi detectada em astrócitos, melanócitos, adipócitos e condrócitos (20). Portanto, considerando o crescente relato da interação de RAGE com o aumento da expressão da proteína S100 $\beta$ , assim como sua ocorrência em adipócitos, julgamos importante pesquisar a relação de S100 $\beta$  com a fisiopatologia da DM2 no tecido adiposo de pacientes diabéticos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Pacientes

Foram selecionados oito pacientes (Tabela 1) na Seção de Coronárias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC). Divididos em dois grupos, quatro pacientes para grupo controle (normoglicêmicos) e quatro pacientes para o grupo de DM2. Todos os pacientes foram informados quanto ao protocolo de estudos previamente aprovado pelo Comitê de Ética do IDPC e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Segundo os critérios de inclusão, foram requeridos indivíduos de ambos os sexos com idade entre 30 e 70 anos, sendo que, para o grupo DM2, estes deveriam apresentar duas glicemias em jejum com valores entre 126 mg/dL e 270 mg/dL em medida casual (com sintomas clínicos) ou duas horas após ingestão de 75 g de glicose; e por meio do teste da hemoglobina glicada (HbA1C) com valores superiores a 6,5%. Os dados dos pacientes foram obtidos por meio de um questionário padronizado.

Foram excluídos pacientes que estivessem em uso de bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, diuréticos tiazídicos, corticosteroides, fibratos e agentes hipoglicemiantes orais como: metformina, repaglinida, acarbose; pacientes com glicemia demasiadamente alta, que necessitassem de terapia insulínica, logo após o diagnóstico ou durante o tratamento; pacientes que necessitam de terapia combinada como hipoglicemiantes orais e mulheres grávidas. Os pacientes com DM2 selecionados para o estudo foram orientados a seguir uma dieta hipocalórica, sem uso de hipoglicemiante oral, por 30 dias, conforme indicação médica.

**Tabela 1.** Sigla representativa dos pacientes pertencentes ao estudo

Grupo controle	Grupo DM2
MAC	ASC
NFC	SSS
AIA	JCM
NMB	DP

### Amostras biológicas

Foram coletadas amostras de tecido adiposo subcutâneo (50 mg), por meio de biópsia por agulha, denominada de *Punch* dermatológico (Koplast, Brasil). Agulha descartável e estéril com cinco mm de diâmetro. Após anes-

tesia local com lidocaína 2% (Xylestesin Cristália, Brasil), o tecido adiposo foi coletado da região lombar direita, por médico cirurgião do IDPC. Após a coleta, o tecido adiposo foi lavado com tampão fosfato salino (PBS) e imerso em 1 ml de reagente estabilizante RNAlater® (Qiagen, Alemanha), mantido em temperatura ambiente por 24 horas e, posteriormente, o reagente foi removido e o tecido armazenado no freezer a -80°C até sua análise.

### Extração do RNA total de tecido adiposo

O tecido adiposo foi homogeneizado com 1 mL de TRIZOL® (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), por 10 segundos, à velocidade de 20.000 rpm, utilizando o homogeneizador de tecido Homomix D-130 (Biosystems, PR, Brasil), com probe de 5 mm. A amostra foi mantida em gelo durante esse processo.

Após a lise e homogeneização, foi realizada a extração, conforme procedimento previamente padronizado no laboratório (21,22). Resumidamente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados aos lisados e os extratos foram centrifugados 12.000 x g por 15 min, a 4 °C. O RNA total presente na fase aquosa foi precipitado com isopropanol gelado, centrifugado a 10.000 x g, por 10 min, 4 °C e lavado com etanol a 75% (v/v). A seguir, o RNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de água esterilizada tratada com (DEPC) (Sigma Aldrich, MO, USA).

### Análise do mRNA total

O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotômetro Nanodrop modelo ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). O grau de pureza do RNA foi determinado pela relação A260nm/A280nm (23).

Os resultados obtidos por meio da quantificação do RNA total são apresentados na tabela 2.

**Tabela 2.** Teores do mRNA total das amostras

Amostra de RNA	Concentração (ng/µL)	Relação A260nm/A280nm
MAC	414,7	2,01
NFC	347,2	1,96
DP	192,8	1,76
ASC	178,7	1,76
NMB	161,3	1,71
SSS	137,3	1,78
JCM	60,2	1,81
AIA	33,8	1,64

### Escolha dos iniciadores e sondas

A sequência dos genes-alvo foi obtida no Banco de genes (Genbank) do *National Institute of Health* (NIH) e exportada para o programa Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os conjuntos de iniciadores e sonda foram selecionados seguindo os critérios e padrões definidos pelo *software* para sondas do tipo TaqMan. Os pares de iniciadores e as respectivas sondas fluorogênicas foram sintetizados pela Applied Biosystems de acordo com a listagem apresentada na tabela 3.

**Tabela 3.** Desenhos dos iniciadores e sondas utilizados

Gene-alvo	Primers Sense (1) Anti-sense (2) e Sonda (3)
S100β	(1) 5'AAGAGGATGTCTGAGCTGGAGAA 3' (2) 5'CCCTCCCTCCAGAATATTGG 3' (3) 5'FAM TGGCCCTCATCGAC MGB 3'
GAPDH	(1) 5'GGAAGGTGAAGGTCCGAGTCA 3' (2) 5'CTGGAAGATGGTATGGGATTC 3' (3) 5'VIC TCAGCCTTGAGGGTGC MGB 3'

### Síntese de cDNA

O cDNA foi obtido a partir 200 ng de RNA, na presença de 200 ng de iniciadores aleatórios (*random primers*) (Invitrogen, MD, EUA), DTT 20 mM (Invitrogen, MD, EUA), 200 dNTP 10 mM (Amersham-Pharmacia Biotech do Brasil, Brasil), 200 U de transcriptase reversa (SuperScript™II RT RNase H<sup>-</sup>) e tampão de RT (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM) (Invitrogen, MD, EUA). O ensaio de RT foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA, EUA).

### Análise da expressão pela PCR em tempo real

A PCR em tempo real com objetivo da quantificação da expressão do mRNA dos genes S100β e GAPDH foi realizada com o equipamento *ABI Prism 7500 fast* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O programa trabalha em três etapas: (1) um ciclo de 2 minutos a 50°C; (2) um ciclo de 10 minutos a 95°C; (3) 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan foram detectados pelo equipamento e os dados analisados pelo programa ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que geram curvas semilogarítmicas dos sinais de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*cicle threshold* ou ciclo limiar), sendo este

o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atinge dado limiar, o que permite a análise quantitativa da expressão do fator em avaliação.

Os valores de Ct obtidos nesses experimentos foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de S100β em relação à do GAPDH. Essa relação é denominada pelo Delta Ct ( $\Delta Ct$ ) e é calculada pela fórmula:

$$\Delta Ct = (Ct \text{ controle endógeno} - Ct \text{ gene-alvo})$$

Em função da característica logarítmica dessa variável, foi utilizado o parâmetro  $2^{-\Delta Ct}$  para a análise dos dados conforme recomendado na literatura (24). Assim, foi possível determinar a expressão gênica individual dos participantes, diabéticos e normoglicêmicos (Tabela 4).

**Tabela 4.** Valores de  $\Delta Ct$  e  $2^{-\Delta Ct}$  para cada amostra

Grupo controle	$\Delta Ct$	$2^{-\Delta Ct}$
MAC	1,4435	0,3676683
NFC	0,3653	0,7762955
NMB	2,3118	0,2014156
AIA	1,3053	0,4046295
Grupo DM2	$\Delta Ct$	$2^{-\Delta Ct}$
SSS	4,7708	0,0366300
ASC	5,7174	0,0190065
JCM	5,2693	0,0259282
DP	4,8620	0,0343859

## RESULTADOS

Os resultados foram analisados com o auxílio do *software* Sigma Stat versão 3.5 (SPSS Inc., Chicago, EUA). O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . Os valores estatísticos apresentados neste artigo são em relação às características biodemográficas dos dois grupos (Tabela 5) e à comparação dos valores de  $2^{-\Delta Ct}$  (Tabela 6); em ambos foram realizados o Test-t de Student. Para os valores de  $2^{-\Delta Ct}$ , foi avaliado também o tamanho de efeito (“*Effect Size*”), por meio da medida de “*Cohen d*”.

**Tabela 5.** Teste-t de Student para os dados biodemográficos de ambos os grupos

Parâmetros	Controle	CV*	DM2	CV <sup>†</sup>	P
Idade (anos)	61,7 ± 5,4	0,087	63,7 ± 11,5	0,180	0,764
Peso (kg)	68,8 ± 4,8	0,069	79,8 ± 15,7	0,196	0,231
Altura (m)	1,59 ± 0,06	0,037	1,68 ± 0,05	0,029	0,097
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,1 ± 2,0	0,073	28,0 ± 4,9	0,175	0,757
Glicemia (mg/dL)	90,2 ± 6,0	0,066	146,5 ± 35,3	0,240	0,049

\* Coeficiente de variabilidade dos parâmetros biodemográficos do grupo controle.

<sup>†</sup> Coeficiente de variabilidade dos parâmetros biodemográficos do grupo DM2.

**Tabela 6.** Teste-t de Student para os valores de  $2^{-\Delta Ct}$

Grupo	Média de $2^{-\Delta Ct}$	Desvio- padrão	P
DM2	0,029	0,008	0,015
Controle	0,438	0,243	

Os resultados evidenciam baixa variabilidade nas amostras do grupo DM2 e diferença significativa entre o  $2^{-\Delta Ct}$  do Grupo DM2 e o grupo controle ( $p \leq 0,015$ ); esta é maior do que seria esperado por acaso.

A expressão do mRNA no grupo DM2 é aproximadamente 15 vezes maior que o grupo controle.

## DISCUSSÃO

A contribuição positiva e inédita deste trabalho, além de evidenciar relação do gene S100β com DM2, é a análise da expressão de mRNA do gene S100β diretamente no tecido adiposo de humanos com DM2 por meio da técnica de RT-PCR em tempo real. Embora algumas limitações devam ser consideradas, quais sejam: número de participantes igual a quatro para cada grupo, o que decorreu da complexidade de apropriação das amostras biológicas, e a ação negativa da insulina na expressão do gene endógeno GAPDH, usado como controle em adipócitos (25), os resultados mostraram de forma consistente e significativa que há coexistência de níveis alterados de S100β e a DM2.

O aumento da expressão do mRNA de S100β dos indivíduos com DM2, cerca de 15 vezes maior, quando comparados aos indivíduos normoglicêmicos (controle), corrobora com resultado similar obtido em estudo com ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Sprague-Dawley) induzidos a diabetes melito do tipo I. Utilizando as técnicas de Northern blot e PCR convencional para diversos tecidos, entre eles o tecido adiposo, Zimmer e cols. (26) concluíram que houve o dobro da transcrição de S100β no grupo induzido a diabetes melito do tipo I em comparação ao grupo de ratos normoglicêmicos.

O aumento observado na transcrição do mRNA do gene S100β pode refletir aumento da quantidade traduzida dessa proteína, o que, contudo, requer comprovação com técnicas de quantificação direta dos teores da proteína S100β, por exemplo a técnica de Western Blotting, como também seria interessante a realização de pesquisas que relacionem a interação entre S100β e RAGEs na DM2.

No estudo comparativo entre os dois grupos com o Test-t de Student e os valores de coeficiente de variabilidade para os parâmetros de idade, peso, altura e IMC, a

amostra se manteve homogênea, ou seja, neste trabalho especificamente com o grupo utilizado, os dados biodemográficos considerados não influenciaram no resultado da expressão gênica de S100β. Esta conclusão também é encontrada e confirmada por outro trabalho (27). Neste projeto, a média de idade de ambos os grupos é elevada, segundo Pham e cols. (27), Portela e cols. (28), Tiu e cols. (29) e Nogueira e cols. (30). A expressão de S100β em diversos tipos celulares é diretamente influenciada pela faixa etária dos pacientes, porém nenhum desses estudos realizou a análise do mRNA da proteína por RT-PCR, contribuição desta pesquisa.

## CONCLUSÃO

A expressão dos genes S100β e GAPDH avaliada pela técnica do RT-PCR em tempo real em amostras de tecido adiposo humano comprovou, de forma inédita, que há expressão significativa entre indivíduos diabéticos e normoglicêmicos (15 vezes maior nos diabéticos,  $p < 0,05$ ), o que evidencia coexistência entre os valores aumentados de transcrição de S100β e a fisiopatologia da DM2. Dado o envolvimento de S100β com processos inflamatórios, a avaliação de seus teores pode contribuir como biomarcador para o diagnóstico da patologia ou do seu grau de severidade.

Agradecimentos: A todos que direta ou indiretamente ajudaram a concretizar este trabalho. Em especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), à professora Mariana Doce Passadore, ao professor Adilson Apolinário, a Natalia Cristine Jukemura, André D. Lucchesi e Sílvia Honda Takada.

Declaração: os autores declaram não haver conflitos de interesse científico neste estudo.

## REFERÊNCIAS

- American Diabetes Association: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997;20:1183-97.
- OMS. Organização Mundial da Saúde. Diabetes Programme. [www.who.int/diabetes/facts/world\\_figures/en](http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en). Acessado em: 18 jan, 2010.
- World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Geneva, World Health Organization; 1999. p. 59.
- Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch Biochem Biophys*. 2003;419(1):1-15.
- Lohwasser C, Neureiter D, Popov Y, Bauer M, Schuppan D. Role of the receptor for advanced glycation end products in hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2009;15(46):5789-98.
- Lue L, Walker DG, Jacobson S, Sabbagh M. Receptor for advanced glycation end products its role in Alzheimer's disease and other neurological diseases. *Future Neurol*. 2009;4(2):167-77.
- Shaw SS, Schmidt AM, Banes AK, Wang W, Stern DM, Marrero MB. S100B-RAGE-mediated augmentation of angiotensin II-induced activation of JAK2 in vascular smooth muscle cells is dependent on PLD2. *Diabetes*. 2003;52:2381-8.
- Valencia JV, Mone M, Zhang J, Weetall M, Buxton FP, Hughes TE. Divergent pathways of gene expression are activated by the RAGE ligands S100b and AGE-BSA. *Diabetes*. 2004;53(3):743-51.
- Xia W, Han J, Huang G, Ying W. Inflammation in ischaemic brain injury: Current advances and future perspectives. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37(2):253-8.
- Leclerc E, Sturchler E, Vetter SW. The S100B/RAGE axis in Alzheimer's disease. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2010;2010:539581.
- Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1450(3):191-231.
- Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33(7):637-68.
- Schafer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*. 1996;21(4):134-40.
- Pawlinski R, Setkowicz Z, Ziąja M, Soltys Z, Janeczko K. Intraleisional injection of interferon gamma affects reactive proliferation of astrocytes in the neonatal rat brain. A preliminary study of the age-dependent effect. *Folia Histochem Cytobiol*. 1999;37:237-42.
- Goddard DR, Berry M, Kirvell SL, Butt AM. Fibroblast growth factor-2 induces astroglial and microglial reactivity in vivo. *J Anat*. 2002;200:57-67.
- Sheng JG, Mrak RE, Bales KR, Cordell B, Paul SM, Jones RA, et al. Overexpression of the neurotrophic cytokine S-100beta precedes the appearance of neuritic beta-amyloid plaques in AP-PV717F mice. *J Neurochem*. 2000;74:295-301.
- Martinez-Contreras A, Huerta M, Lopez-Perez S, Garcia-Estrada J, Luquin S, Beas Zarate C. Astrocytic and microglia cells reactivity induced by neonatal administration of glutamate in cerebral cortex of the adult rats. *J Neurosci Res*. 2002;67:200-10.
- Nishi M, Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. Enhanced synaptophysin immunoreactivity in rat hippocampal culture by 5-HT 1A agonist, S100b, and corticosteroid receptor agonists. *Synapse*. 1996;23(1):1-9.
- Gonzalez-Perez O, Ramos-Remus C, Garcia-Estrada J, Luquin S. Prednisone induces anxiety and glial cerebral changes in rats. *J Rheumatol*. 2001;28:2529-34.
- Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*. 2003;60(6):540-51.
- Salazar LA, Hirata MH, Quintão ECR, Hirata RD. Lipid lowering response of the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin is influenced by polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian patients with primary hypercholesterolemia. *J Clin Lab Anal*. 2000;14(3):125-31.
- Massier KB, Hirata MH, Silva AE, Ferraz ML, Nguyen NY, Hirata RD. Interferon-alpha receptor 1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells is associated with response to interferon-alpha therapy of patients with chronic hepatitis. *C Braz J Med Biol Res*. 2004;37(5):643-7.
- Sambrook J, Russel DM. Agarose gel electrophoresis. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. Cold Spring Harbor: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, cap. 7; 2001. p. 743-5a.
- Kenneth JL, Thomas DS. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Meth*. 2001;25:402-8.

25. Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, Maachi M, Capeau J, Caron M. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311(2):372-9.
26. Zimmer DB, Chessher J, Wilson GL, Zimmer WE. S100A1 and S100B Expression and Target Proteins in Type I Diabetes. *Endocrinology.* 1997;138(12):5176-83.
27. Pham N, Fazio V, Cucullo L, Teng Q, Biberthaler P, Bazarian JJ, et al. Extracranial sources of S100B do not affect serum levels. *PLoS One.* 2010;10;5(9):1-9.
28. Portela LV, Tort AB, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Walz R, et al. The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem.* 2002;48(1):950-2.
29. Tiu SC, Chan WY, Heizmann CW, Schäfer BW, Shu SY, Yew DT. Differential expression of S100B and S100A6(1) in the human fetal and aged cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000;119(2):159-68.
30. Nogueira MI, Abbas SY, Campos LGM, Allemandi W, Lawson P, Takada SH, et al. S100b protein expression: gender- and age-related daily changes. *Neurochem Res.* 2009;34(8):1355-62.