



AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO RS2910164 C>G NO GENE DO MIR-146A NA RETINOPATIA DIABÉTICA

Renan C. Sbruzzi¹
Evelise R. Polina²
Daisy Crispim³
Luis H. Canani⁴
Maria E. Silva⁵
Kátia Gonçalves dos Santos⁶

Resumo

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica que tem como uma das principais complicações crônicas a retinopatia diabética (RD). Os microRNAs são pequenos RNAs endógenos, não codificadores que regulam a expressão gênica a nível pós-transcricional. Estudos recentes têm demonstrado o papel destes microRNAs na fisiopatologia do DM e suas complicações. Neste estudo, avaliamos a associação do polimorfismo rs2910164C>G no gene do miR-146a com a presença de retinopatia diabética e sua gravidade em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. A genotipagem do polimorfismo foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real, utilizando-se 'primers' e sondas de hidrólise específicos para a genotipagem desta variante. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre os casos e controles por meio do teste de qui-quadrado ou do teste exato de Fisher. As frequências genotípicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos de pacientes. As frequências genotípicas e alélicas obtidas entre os controles e casos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (genótipos GG=56,3%; CG=35,6%; CC=8,1% e GG=59,9%; CG=33,5%; CC=6,6%, respectivamente, $p=0,705$; alelo C=0,26 e 0,23, respectivamente, $p=0,431$). Quanto à gravidade da RD, as frequências genotípicas e alélicas entre os grupos sem RD, com RD não-proliferativa e com RD proliferativa também não diferiram significativamente (GG=59,9%; CG=33,5%; CC=6,6%; GG=58,1%; CG=34,4%; CC=7,5%; e GG=54,1%; CG=37,2%; CC=8,7%, respectivamente, $p=0,861$; e alelo C=0,23; 0,25 e 0,27, respectivamente, $p=0,503$). Os dados obtidos indicam que não há associação entre o polimorfismo rs2910164C>G no gene do miR-146a e a RD ou sua gravidade.

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

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos, que altera o metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. Caracteriza-se por

1Aluno do Curso de Graduação de Biomedicina ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS – renansbruzzi@hotmail.com

2Pós-doutoranda do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde (PPGBioSaúde)/ULBRA

3Professora do PPG em Endocrinologia/UFRGS

4Professor do Departamento de Medicina Interna/UFRGS

5Doutoranda do PPGBioSaúde/ULBRA

6Professora do Curso de Biologia/ULBRA

hiperglicemia crônica, frequentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial (*American Diabetes Association*[ADA], 2015; Sociedade Brasileira de Diabetes [SBD], 2015). O diabetes mellitus tipo 2(DM2) constitui um grave problema de saúde pública em razão de sua elevada prevalência, acentuada morbidade e mortalidade e das repercussões econômicas e sociais decorrentes do impacto das complicações vasculares, que comprometem a qualidade de vida e a produtividade dos indivíduos afetados, além dos elevados custos do seu tratamento (Oliveira, 2004).

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação crônica do diabetes, que ocorre em mais de 60% dos pacientes com DM2 e se caracteriza por alterações gradualmente progressivas na microvasculatura da retina que, ao atingirem sua forma mais grave, podem resultar na perda irreversível da visão (CHISTIYAKOV, 2011; SIVAPRASAD ET AL., 2012). Na etapa inicial da RD, ocorre a degeneração seletiva dos pericitos (células intramurais do capilar retiniano) e o espessamento da membrana basal. Conseqüentemente, as células endoteliais proliferam-se, levando à formação de capilares dilatados (microaneurismas). Com o subseqüente desequilíbrio na autorregulação do fluxo sanguíneo ocorre um aumento da pressão hidrostática nos capilares retinianos, levando ao rompimento da barreira hematorretiniana. A oclusão dos capilares resulta em áreas de não-perfusão e hipóxia, com a subseqüente dilatação dos capilares pré-existentes ou formação de vasos em “forma de colar”. As áreas de não-perfusão estimulam o crescimento de novos vasos que se formam na superfície da retina, no disco óptico ou em outras regiões. A neovascularização pode permanecer estável e sofrer regressão espontânea, ao passo que, em alguns casos, ocorre uma rápida progressão que confere um elevado risco para a subseqüente perda visual. Além disso, o tecido conjuntivo que se forma ao redor dos neovasos pode contrair, levando à tração e ao descolamento da retina. Assim, as hemorragias, o descolamento da retina e o tecido fibroso residual contribuem para a perda irreversível da visão (AGARDH; AGARDH, 2004; KOLLIAS; ULBIG, 2010; ANTONETTI ET AL., 2012).

Os microRNAs (miRNAs ou miRs) são pequenos RNAs endógenos, não-codificadores, que regulam a expressão gênica ao nível pós-transcricional. Os microRNAs são transcritos primeiramente pela RNA polimerase II em transcritos primários (pri-miRs) no núcleo. Um complexo formado por uma ribonuclease (“Drosha”) associada à proteína DGCR8 processa o pri-miR em pré-miR (precursor). Posteriormente, esse pré-miR é exportado para o citoplasma, através da exportina-5, onde é reconhecido e clivado pela ribonuclease “Dicer”, gerando a molécula madura de microRNA. Após, a proteína argonauta, da família das endonucleases, interage para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), essencial para direcionar o microRNA até o mRNA-alvo. O reconhecimento do alvo pelo microRNA ocorre na região 3' do mRNA-alvo, devido à complementariedade com a sequência “seed” presente na região 5' do microRNA. Dependendo do grau de complementariedade, o mRNA-alvo é clivado ou sua tradução é inibida, ou ainda, é direcionado para a degradação nos corpúsculos P (Kim, 2005; Filipowicz et al., 2008). Considerando que os miRNAs podem modular processos fisiológicos e a patofisiologia de diversas doenças, é reconhecido que existe a necessidade de identificar os microRNAs (e seus alvos) associados com as complicações do diabetes, pois isto propiciaria a identificação de novos biomarcadores e alvos terapêuticos (KANTHARIDIS et al., 2011; LORENZEN et al., 2012; NATARAJAN et al., 2012; SHANTIKUMAR et al., 2012; GUAY; REGAZZI, 2013). Estudos recentes têm mostrado o papel dos microRNAs no desenvolvimento do diabetes, nefropatia diabética e doenças cardiovasculares (Kantharidis et al., 2011; Lorenzen et al., 2012; Natarajan et al., 2012). Em 2012, Wu e colaboradores avaliaram o perfil de expressão de microRNAs na RD em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina. Os resultados demonstraram que 11 microRNAs estavam hiperexpressos, enquanto 6 microRNAs estavam acentuadamente hipoexpressos nos ratos com RD. Os níveis do miR-182, miR-96, miR-183,

miR-211, miR-204 e miR-124 estavam aumentados durante o progresso da RD, ao passo que os níveis do miR-10b, miR-10a, miR-219-2-3p, miR-144, miR-338 e miR-199a-3p estavam diminuídos.

Como descrito anteriormente, o DM e suas complicações são um grave problema de saúde pública a nível mundial, devido aos elevados custos e a crescente prevalência. Evidências recentes e cada vez mais numerosas mostram que os microRNAs podem exercer um papel essencial na patogênese do diabetes e de suas complicações crônicas por meio de sua capacidade de regular os níveis de expressão dos genes que atuam na diferenciação, crescimento e proliferação celular, assim como na apoptose. Apesar disso, até o momento, poucos estudos investigaram o perfil de expressão de microRNAs na retinopatia e nefropatia diabéticas.

O presente estudo de caso-controle como objetivo avaliar a possível associação do polimorfismo rs2910164 C>G no gene do miR-146a com a retinopatia diabética em pacientes ambulatoriais com DM2.

METODOLOGIA

Foram selecionados para o estudo 527 pacientes com DM2 atendidos nos ambulatórios dos Serviços de Endocrinologia dos seguintes hospitais: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Grupo Hospitalar Conceição (Porto Alegre/RS), Hospital São Vicente de Paulo (Passo Fundo/RS) e Fundação Universitária de Rio Grande (Rio Grande/RS). Os pacientes com DM2 foram classificados em casos (n=360) ou controles (n=167), de acordo com a presença ou ausência de RD, sendo que os controles deveriam ter, no mínimo, 5 anos de DM para serem incluídos no estudo. O DNA foi extraído dos leucócitos do sangue periférico pelo método de *salting out*. A genotipagem do polimorfismo rs2910164C>G no gene do miR-146a foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real utilizando-se 'primers' e sondas de hidrólise específicos para a genotipagem desta variante. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre os casos e controles por meio do teste de qui-quadrado ou do teste exato de Fisher no pacote SPSS ou no WinPEPI.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características clínicas e demográficas dos pacientes com e sem RD estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização clínica e demográfica dos pacientes com DM2

	Sem RD	Com RD	p
Sexo Masculino (%)	83,3	51	0,009
Idade (anos)	62±9	62±9	0,921
Tempo de DM (anos)	16±6	15±9	0,165
IMC (Kg/m ²)	28±5	28±5	0,594
Hipertensão(%)	73,5	76,6	0,532
Uso Insulina (%)	32	53	<0,001
Creatinina (mg/dL)	1,3 (0,6-10,8)	2,3 (0,5-13,9)	<0,001
HDL (mg/dL)	46,1±11,9	42,5±12,3	0,001

Os dados estão apresentados como média ± DP, média (min-max) ou porcentagem.
IMC: Índice de massa corporal

Os dados apresentados na Tabela 1 mostram que o grupo de estudo é composto, em sua maioria, por indivíduos do sexo masculino e hipertensos. O grupo de casos apresentou médias maiores no uso de insulina e dosagem de creatinina, indicando estágios mais avançados de DM2 e possível comprometimento renal.

As frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo estudado nos casos (pacientes com RD) e controles (sem RD) estão apresentadas na Tabela 2. As frequências genótípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos.

Tabela 2: Frequências genótípicas e alélicas obtidas no grupo controle (sem RD) e no grupo de casos (com RD)

	Controles (n=167)	Casos (n=360)	
GG	100 (53,6%)	203 (59,9%)	P= 0,705
GC	56 (35,6%)	128 (33,5%)	
CC	11 (8,1%)	29 (6,6%)	
G	0,76	0,74	P= 0,431
C	0,24	0,26	

A Tabela 3 mostra as frequências genótípicas e alélicas nos grupos de pacientes sem RD, com RD não-proliferativa e com RD proliferativa, separados de acordo com a gravidade da RD.

Tabela 3: Frequências genótípicas e alélicas obtidas nos pacientes sem RD, com RD não-proliferativa e com RD proliferativa.

	Sem RD	RD não-proliferativa	RD Proliferativa	p
GG	100 (59,9%)	123 (58,1%)	80 (54,1%)	0,861
GC	56 (33,5%)	73 (34,4%)	55 (37,2%)	
CC	11 (6,6%)	16 (7,5%)	13 (8,7%)	
G	0,77	0,75	0,73	0,503
C	0,23	0,25	0,27	

Como apresentado nas tabelas acima, as comparações das frequências genótípicas e alélicas obtidas entre os casos e controles ou entre os pacientes sem RD, com RD não-proliferativa e com RD proliferativa não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, não indicando associação do polimorfismo rs2910164 G>C com a presença de retinopatia diabética ou com sua gravidade.

A literatura referente ao polimorfismo rs2910164 apresenta resultados bastante contrastantes quanto ao alelo de risco em diferentes patologias e etnias. O genótipo CC foi associado ao aumento no risco de desenvolvimento de várias doenças, incluindo doença arterial coronariana numa população indiana (Ramkaranet al., 2013). Por outro lado, um estudo realizado por Ciccacciet al., em 2014, aponta o alelo C e o genótipo CC como protetores contra o desenvolvimento de neuropatia autonômica cardiovascular diabética em uma população caucasiana.

Num estudo realizado em 2016 por Kaidonis e colaboradores, foi encontrada uma associação significativa do alelo C com a presença de nefropatia diabética em pacientes com

DM tipo 1. A frequência do alelo C também foi maior nos pacientes com os estágios mais graves da RD do que nos controles com DM2.

Mais estudos são necessários para melhor compreender o papel do polimorfismo rs2910164 no DM e suas complicações, assim como estudos de expressão. Além disso, o miR-146a pode ter um potencial terapêutico para o tratamento ou prevenção das complicações microvasculares do DM.

REFERÊNCIAS

- AGARDH, E.; AGARDH, C.D. Diabetic retinopathy. In: DEFRONZO, R.A., FERRANNINI, E., KEEN, H., ZIMMET, P. (Eds.). *International Textbook of Diabetes Mellitus*. 3ª ed. Chichester: John Wiley & Sons, p. 1187-1206, 2004.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes - 2015. *Diabetes Care*, v. 38, s. 1, 2015.
- ANTONETTI D.A.; KLEIN R.; GARDNER TW. Diabetic retinopathy. Wisconsin: *New England Journal of Medicine*. v. 366, n. 13, p. 1227-1239, Mar 2012.
- CHISTIakov DA. Diabetic retinopathy: Pathogenic mechanisms and current treatments. Amsterdam: *Diabetes & Metabolic Syndrome*. v. 5, n. 3, p. 165-172, Jul 2011.
- CICCACCI C et al. Common polymorphisms in MIR146a, MIR128a and MIR27a genes contribute to neuropathy susceptibility in type 2 diabetes. Berlin: *Acta Diabetol*. v. 51, n. 4, p. 63-671, Ago 2014.
- FILIPOWICZ W; BHATTACHARYYA SN; SONENBERG N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Boston: *Nature Reviews Genetics*. v. 9, n. 2, p. 102-114, Fev 2008.
- GUAY C; REGAZZI R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. Boston: *Nature Reviews Endocrinology*. v. 9, n. 9, p. 513-521, Set 2013.
- KAIDONIS G et al. A single-nucleotide polymorphism in the microRNA-146a gene is associated with diabetic nephropathy and sight-threatening diabetic retinopathy in caucasian patients. Berlin: *Acta Diabetol*. v.28, n. 2, Mar 2016.
- KANTHARIDIS P et al. Diabetes complications: the microRNA perspective. Boston: *Diabetes*. v. 60, n. 7, p. 1832-1837, Jul 2011.
- KIM V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Boston: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. v. 6, n. 5, p. 376-385, Mai 2005.
- KOLLIAS, A.; ULBIG M. Diabetic retinopathy: early diagnosis and effective treatment. Cologne: *Deutsches Ärzteblatt International*. v. 107, n. 5, p. 75-84, Fev 2010.
- LORENZEN, J. et al. MicroRNAs in diabetes and diabetes-associated complications. Georgetown: *RNA Biology*. v. 9, n. 6, p. :820-827, Jun. 2012
- NATARAJAN R; PUTTA S; KATO M. MicroRNAs and diabetic complications. New York: *Journal of Cardiovascular Translational Research*. v. 5, n. 4, p. 413-422, Ago 2012.
- OLIVEIRA, J.E.P. Conceito, classificação e diagnóstico do diabetes mellitus. In: OLIVEIRA, J.E.P.; MILECH, A. (Eds.). *Diabetes Mellitus: Clínica, Diagnóstico, Tratamento Multidisciplinar*. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, p. 7-18, 2004.
- RAMKARAN P et al. miR-146a polymorphism influences levels of miR-146a, IRAK-1, and TRAF-6 in Young Patients with coronary artery Disease. Totowa: *Cell Biochem Biophys*. v. 68, n. 2, p. 259-266, Mar 2014.
- SHANTIKUMAR S.; CAPORALI A.; EMANUELI C. Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications. London: *Cardiovascular Research*. v. 93, n. 4, p. 583-593, Mar 2012.
- SIVAPRASAD S. et al. Prevalence of diabetic retinopathy in various ethnic groups: a worldwide perspective. New York: *Survey of Ophthalmology*. v. 57, n. 4, p. 347-370, Ago 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes*. São Paulo: AC Farmacêutica, 2015. 376p.