



## **AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs2910164 C>G NO GENE DO MIR-146 COM A RETINOPATIA E A NEFROPATIA DIABÉTICAS.**

Autores: Renan C. Sbruzzi, Aluno do Curso de Graduação de Biomedicina ULBRA

Evelise R. Polina, Pós-doutoranda do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

Daisy Crispim, Professora do PPG em Endocrinologia/UFRGS

Luis H. Canani, Divisão de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Maria E. Silva, doutoranda do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

Kátia G. dos Santos, Faculdade de Ciências Biológicas/ULBRA

**Resumo:** O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção ou na ação da insulina. Esta hiperglicemia crônica está associada à disfunção e à falência, a longo prazo, de vários órgãos, afetando principalmente os olhos, os rins e o coração. A retinopatia diabética (RD) é uma complicação crônica do DM, caracterizada por alterações progressivas na microvasculatura da retina que, em seus estágios mais graves, pode causar a perda irreversível da visão. A nefropatia diabética (ND) é uma síndrome identificada pela presença de quantidades patológicas e excreção de albumina urinária, dano e perda da taxa de filtração glomerular. Ela acomete cerca de 40% dos pacientes com DM2 e é a principal causa de insuficiência renal terminal. Os microRNAs são pequenos RNAs endógenos, não codificadores que regulam a expressão gênica a nível pós transcricional pela degradação ou inibição de seus genes-alvo. Diversos estudos recentes têm demonstrado o papel destes microRNAs na fisiopatologia do DM, nefropatia diabética e doenças cardiovasculares. Neste estudo, avaliamos a possível associação do polimorfismo rs2910164 C>G no gene do MiR-146 com a retinopatia e nefropatia diabéticas em pacientes ambulatoriais com diabetes mellitus tipo 2. As análises genéticas foram realizadas por meio da técnica de PCR seguida da digestão com enzima de restrição. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% e corados com brometo de etídeo, para visualização direta dos fragmentos de restrição e identificação dos genótipos. As frequências gênicas 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. As frequências genotípicas obtidas para o polimorfismo entre os casos com RD e controles não foi estatisticamente significativa (GG= 56,1%; GC= 31,6%; CC= 15,3 e GG= 63%; GC= 33,3%; CC= 3,7%, respectivamente,  $p= 0,454$ ) A

freqüência do alelo C entre os grupos também não diferiu significativamente (C= 0,28 e C= 0,20, respectivamente, p= 0,380). Entre os casos com ND e controles, as freqüências genotípicas (GG= 64,5%; GC= 22,6%; CC=15,3% e GG= 53,1%; GC= 34,4%; CC= 12,5%, respectivamente, p= 0,585) também não apresentaram diferença estatisticamente significativa, assim como a freqüência do alelo C (C= 0,24 e C= 0,30, respectivamente, p= 0,642). Os resultados preliminares não indicam a associação do polimorfismo de estudo com a retinopatia ou nefropatia diabéticas.

Palavras-chave: Retinopatia Diabética; Nefropatia Diabética; miR-146; Polimorfismo

## Introdução

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção ou ação da insulina. Esta hiperglicemia crônica no DM está relacionada à disfunção e à falência, a longo prazo, de vários órgãos, afetando principalmente os olhos, os rins e o coração. (American Diabetes Association, 2013; Trisha Dunning, 2013). O 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 (Chistiakov, 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 subsequente 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 subsequente 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 subsequente 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 e Agardh, 2004; Kollias e Ulbig, 2010; Antonetti et al., 2012).

A nefropatia diabética (ND) é a principal causa de doença renal crônica

em pacientes começando a terapia de substituição renal e afeta aproximadamente 40% dos pacientes com DM2 (Gross et al, 2005). A ND incipiente (microalbuminúria) está associada ao aumento da mortalidade em doenças cardiovasculares em pacientes com DM2 (Gross et al, 2005; Bo et al, 2005). As alterações morfológicas da ND manifestam-se como hipertrofia glomerular, perda de podócitos, espessamento da membrana basal glomerular e expansão da matriz tanto no mesângio como no interstício tubular. Estas anomalias estruturais resultam no extravasamento da albumina dos glomérulos e a diminuição progressiva da função renal (Declèves e Sharma, 2010). A etiologia da ND é multifatorial, havendo uma interação entre fatores de risco ambientais e genéticos (Fogarty et al, 2000; Lindner et al, 2003).

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 e 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 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 ND e RD.

O presente estudo de caso-controle como por objetivo avaliar a associação do polimorfismo rs2910164 C>G no gene do miR-146 com a Nefropatia e Retinopatia diabéticas em pacientes ambulatoriais com DM2.

## **Materiais e Métodos**

Foram selecionados para o estudo 500 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=250) ou controles (n=250), 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. Também foram incluídos 100 indivíduos doadores de banco de sangue do HCPA, sem história pessoal ou familiar de DM, avaliados por meio de uma entrevista com questionário padronizado, que constituirão uma amostra que servirá como referência da distribuição do polimorfismo na população em geral.

O DNA foi extraído dos leucócitos do sangue periférico por um método de salting out. A genotipagem do polimorfismo no gene do mir-146 C>G foi realizada por meio da técnica de PCR-RFLP. Os produtos da digestão com a enzima de restrição *SacI* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 3% e corados com brometo de etídeo, para visualização dos fragmentos de restrição e identificação dos genótipos. As frequências gênicas 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**

### **Caracterização do grupo de estudo:**

Até o momento foram genotipadas 84 amostras do grupo de estudo, estando divididas entre casos e controles para análise de acordo com a presença ou ausência de RD e ND.

A tabela 1 demonstra a caracterização demográfica e clínica dos pacientes com DM2 componentes do grupo de estudo. Como exposto, a amostra é constituída em sua maioria de indivíduos do sexo feminino, obesos, não fumantes, hipertensos e com dosagens relativamente altas de HDL, LDL, triglicerídeos e creatinina.

**Tabela 1: Caracterização clínica e demográfica dos pacientes com DM2**

|   |         |
|---|---------|
| Idade (anos)                                  | 62±9    |
| Sexo Masculino (%)                            | 44      |
| Tempo de DM (anos)                            | 14±7    |
| Índice de Massa Corporal (Kg/m <sup>2</sup> ) | 29±5    |
| Histórico de Tabagismo (%)                    | 45      |
| Hipertensão (%)                               | 72      |
| Uso de Insulina (%)                           | 32      |
| HbA <sub>1c</sub> Total (mg/dl)               | 7,4±1,5 |
| LDL (mg/dl)                                   | 144±44  |
| HDL (mg/dl)                                   | 43±10   |
| Creatinina (mg/dl)                            | 1,2±0,6 |
| Retinopatia Diabética                         | 68      |
| Nefropatia Diabética                          | 48      |

Os dados estão apresentados em % ou média ± desvio padrão

### **Polimorfismo rs2910164 C>G no gene do MiR-146 e a Retinopatia e Nefropatia Diabéticas:**

As tabelas 2 e 3 apresentam as frequências genotípicas e alélicas obtidas para o polimorfismo estudado nos pacientes com RD e ND, respectivamente, em comparação com o grupo controle.

**Tabela 2: Frequências genotípicas e alélicas obtidas nos pacientes com RD e controles**

|    | Casos (n= 57) | Controles (n= 27) |       |
|----|---------------|-------------------|-------|
| GG | 32 (56,1%)    | 17 (63,0%)        | 0,454 |
| GC | 18 (31,6%)    | 9 (33,3%)         |       |
| CC | 7 (15,3%)     | 1 (3,7%)          |       |
| G  | 0,72          | 0,80              | 0,380 |
| C  | 0,28          | 0,20              |       |

**Tabela 3: Frequências genotípicas e alélicas obtidas nos pacientes com ND e controles**

|    | Casos (n= 31) | Controles (n= 32) |       |
|----|---------------|-------------------|-------|
| GG | 20 (64,5%)    | 17 (53,1%)        | 0,585 |
| GC | 7 (22,6%)     | 11 (34,4%)        |       |
| CC | 4 (12,9%)     | 4 (12,5%)         |       |
| G  | 0,76          | 0,70              | 0,621 |
| C  | 0,24          | 0,30              |       |

Como exposto nas tabelas, as frequências obtidas para o polimorfismo rs2910164 C>G no gene do MiR-146 entre o grupo de casos e controles não apresentaram diferença estatisticamente significativa, não indicando, assim, sua associação com a retinopatia ou nefropatia diabéticas.

### **Discussão**

Tendo em vista que o número amostral analisado até o momento é bastante limitado, tratando-se apenas de 84 indivíduos e que inúmeros estudos, como anteriormente citado, indicam o papel dos polimorfismos nos genes codificadores de microRNAs na fisiopatologia da DM e das suas complicações, a genotipagem das amostras do grupo de estudo terá continuidade afim de confirmar os resultados obtidos até o momento com um poder amostral maior.

### **Referências Bibliográficas:**

AGARDH, E.; AGARDH, C. Diabetic retinopathy. In: DE FRONZO RA et al (eds) International Textbook of Diabetes Mellitus. West Sussex: John Wiley & Sons. v. 3, n. 6, p. 1187-1206 Jul, 2004.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Virginia: Diabetes Care, 2013.

ANTONETTI, D.; KLEIN, R.; GARDNER TW. Diabetic retinopathy. Boston: **New England Journal of Medicine**. v. 29, n. 366, p. 1227-1239, Mar. 2012.

BO, S. et al. Renal damage in patients with type 2 diabetes: a strong predictor of mortality. Oxford: **Diabet Medicine**. V. 22, n. 3, p. 258-65, Mar. 2005.

CHISTIYAKOV, D.. Diabetic retinopathy: Pathogenic mechanisms and current treatments. Amsterdam: **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**. v. 5, n. 3, p.165-172, Set. 2011.

DECLÈVES, A.; SHARMA, K. New pharmacological treatments for improving renal outcomes in diabetes. London: **Nature Reviews Nephrology**. v. 6, n. 6, p. 371–380, Jun. 2010.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? London: **Nature Reviews Genetics**. v. 9, n. 2, p. 102-14.

FOGARTY DG et al. Segregation analysis of urinary albumin excretion in families with type 2 diabetes. New York: **Diabetes**. V. 49, n. 6, p. 1057-63, Jun. 2000.

GUAY C.; REGAZZI R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. London: **Nature Reviews Endocrinology**. V. 9, n. 9, p. 513-21, Set. 2013.

GROSS J. et al. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. New York: **Diabetes Care**. v. 28, n. 1, p. 164-76, Jan. 2005.

KANTHARIDIS P et al. Diabetes complications: the microRNA perspective. New York: **Diabetes**. v. 60, n. 7, p. 1832-1837, Jul. 2011.

KIM V. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. London: *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.

LINDNER, T. et al. Genetic aspects of diabetic nephropathy. **Kidney International Supplement**. v. 8, n 84, p. 186-91, Mai. 2003.

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. Conceito, classificação e diagnóstico do diabetes mellitus. In: OLIVEIRA J.; MILECH, A. (eds) **Diabetes Mellitus: Clínica, Diagnóstico, Tratamento Multidisciplinar**. São Paulo: 2004 1ª ed. Atheneu,, p. 7-18.

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, Jul. 2012.

TRISHA DUNNING AM. Brief overview of diabetes, the disease. In: TRISHA DUNNING AM (ed) **Diabetes Education: Art, Science and Evidence**, 1º ed. West Sussex: John Wiley & Sons, p. 1-11, 2013.



