



**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO RS2910164 C>G NO GENE DO  
MIR-146 COM A DOENÇA RENAL DO DIABETES**

Lucas Bustamante<sup>1</sup>  
Evelise R. Polina<sup>2</sup>  
Daisy C. Moreira<sup>3</sup>  
Luis H. Canani<sup>4</sup>  
Maria E. Silva<sup>5</sup>  
Kátia Gonçalves dos Santos<sup>6</sup>

**Resumo**

O diabetes mellitus (DM) é a síndrome metabólica e endócrina mais comum caracterizada por complicações crônicas microvasculares, como a nefropatia diabética ou doença renal do diabetes (DRD), como é denominada atualmente. A DRD é uma síndrome caracterizada pela presença de quantidades anormais de excreção de albumina urinária, dano glomerular e perda da taxa de filtração glomerular em pacientes com diabetes. Os microRNAs são RNAs pequenos, enantrópicos, não-codificadores e que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente. Na fisiopatologia do DM e da ND, os microRNAs têm um papel importante, demonstrado em muitos estudos atuais. O objetivo deste estudo de caso-controle é investigar se existe associação do polimorfismo rs2910164C>G no gene do miR-146a com a DRD em pacientes ambulatoriais com diabetes mellitus tipo 2 (DM2). O DNA foi isolado do sangue venoso periférico por um método de “salting out” e a genotipagem foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real. As frequências gênicas e genotípicas foram comparadas entre os pacientes com DRD (casos) e sem DRD (controles) por meio do teste de qui-quadrado ou do teste exato de Fisher no pacote SPSS ou no WinPEPI. As frequências genotípicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos de pacientes. As frequências genotípicas e alélicas obtidas nos casos e controles não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (genótipos GG=58,9%; CG=33,1%; CC=8,0% e GG=61,3%; CG=32,3%; CC=6,4%, respectivamente, p=0,806; alelo C=24,5% e 22,5%, respectivamente, p=0,586). Os resultados não indicam a associação do polimorfismo de estudo com a doença renal do diabetes.

Palavras-chave: Diabetes mellitus; Doença renal do diabetes; MicroRNA; Polimorfismo.

**INTRODUÇÃO**

O diabetes mellitus (DM) é a síndrome metabólica e endócrina mais comum caracterizada por níveis de glicose sanguínea cronicamente elevados resultante de defeitos na secreção e/ou na ação da insulina. As consequências do DM a longo prazo decorrem de alterações micro e macrovasculares que levam à disfunção e falência de vários órgãos,

---

1Aluno do Curso de Graduação de Farmácia ULBRA – Bolsista PIBIC/CNPq – bustamante.farma@gmail.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

afetando principalmente os olhos, rins e o coração (DUNNING, 2013; *American Diabetes Association* [ADA], 2015). O diabetes mellitus tipo 2 (DM2), o qual afeta de 80% a 90% dos casos de DM, 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). Projeções recentes predizem que a prevalência global do DM2, estimada em 366 milhões de casos em 2011, irá aumentar para 552 milhões em 2030 (WANG et al., 2015).

A nefropatia diabética (ND) ou doença renal do diabetes (DRD), como denominada atualmente, é uma síndrome caracterizada pela presença de quantidades patológicas de excreção de albumina urinária, dano glomerular e perda da taxa de filtração glomerular (TFG) em pacientes com diabetes (LIM, 2014). A ND é a principal causa de insuficiência renal terminal, na qual ocorrem alterações na vasculatura renal, fazendo com que haja a perda de proteína na urina. Esta complicação acomete cerca de 30 a 40% dos pacientes com DM2 e está associada a um aumento da mortalidade, podendo evoluir para a perda progressiva da função renal, fazendo-se necessário o uso de medidas de reposição da função renal. Diversos fatores de risco têm sido descritos para a ND, como o grau de hiperglicemia, o tempo de duração do diabetes, a presença de hipertensão arterial, o fumo e os fatores genéticos (ZELMANOVITZ et al., 2009; LIM, 2014). Além disto, é um fator de risco para a doença cardiovascular, a principal causa de morte nos pacientes com DM2 (GROSS, 2003). A doença renal crônica (DRC) caracteriza-se pela lesão renal com perda progressiva e irreversível da função dos rins (glomerular, tubular e endócrina). Em sua fase mais avançada (chamada de doença renal terminal - DRT), os rins não conseguem mais manter as suas funções regulatórias. As principais causas da insuficiência renal crônica são a hipertensão arterial, diabetes mellitus, história familiar de DRC e envelhecimento (ROMÃO, 2004; *American Diabetes Association* [ADA], 2014).

Os microRNAs (miRNAs ou miRs) são RNAs pequenos (com aproximadamente 20-22 nucleotídeos), enantropicos, não-codificadores e que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente. Os miRNAs podem reprimir, degradar ou inibir a expressão gênica (BARTEL, 2004). A ação dos miRNAs ocorre pela ligação incompleta da sequência “seed” no final 5’ do miRNA para o sítio complementar alvo 3’ da região não-traduzida do RNA mensageiro. miRNAs são transcritos do DNA em miRNAs primários (pri-miRNAs), os quais contêm estruturas com formato de grampo. RNase III Droscha e seu cofator, Síndrome DiGeorge da Região Crítica do gene 8 (DGCR8), ligam-se às estruturas de grampo no Pri-miRNAs e os processam em miRNAs precursores (pré-miRNAs). Através da exportina 5, pré-miRNAs são transferidos para o citoplasma e são processados por outra enzima, denominada Dicer, em colaboração com a proteína ligante de RNA transativadora de resposta (TRBP), para gerar o miRNA maduro. Uma parte do duplex transforma-se em complexo silenciador de RNA-induzido (RISC), enquanto a outra é degradada. No RISC, o miRNA maduro reconhece os mRNAs-alvo através da sequência complementar, resultando na degradação do mRNA-alvo (complementariedade perfeita para o 3’ UTR) ou, mais frequentemente, na inibição da tradução (complementariedade imperfeita do 3’ UTR) (WU et al., 2014).

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 (NATARAJAN et al., 2012; SHANTIKUMAR et al., 2012; 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). Nos últimos anos, mais de 20 estudos em modelos murinos e cultura celular demonstraram que vários microRNAs contribuem para o desenvolvimento da ND, enquanto outros apresentam efeitos renoprotetores (WU et al., 2014). Entre os microRNAs hiperexpressos na ND estão o miR-21, miR-29c, miR-124 e miR-200b/c, que têm como alvos os genes codificadores de proteínas da matriz extracelular, levando ao aumento da sobrevivência, hipertrofia e fibrose da matriz mesangial. Já os microRNAs hipoexpressos envolvem a família do miR-29 e do let-7b, que têm como alvos os genes do colágeno, do VEGF e do receptor 1 do fator de crescimento transformante, entre outros (MCCLELLAND, KANTHARIDIS, 2014; WU et al., 2014).

Em todo o mundo o diabetes mellitus e suas complicações têm sido um intenso problema para a saúde, em virtude dos altos custos e a preponderância com que vem crescendo. A maior parte dos estudos de associação genética têm avaliado a ocorrência de polimorfismos nas regiões codificadoras dos genes. Porém, as evidências sugerem que polimorfismos nas regiões não-codificadoras, incluindo o promotor, os acentuadores e as regiões “seed” dos microRNAs, podem ter um efeito significativo na patogênese de diversas doenças (NATARAJAN et al., 2012).

O objetivo deste estudo de caso-controle é investigar se existe associação do polimorfismo rs2910164C>G no gene do miR-146a com a doença renal do diabetes em pacientes ambulatoriais com DM2.

## METODOLOGIA

Para este estudo de caso-controle foram selecionados 367 pacientes com DM2 atendidos nos ambulatórios dos Serviços de Endocrinologia de quatro hospitais do Rio Grande do Sul. Os pacientes com DM2 foram divididos em casos (163) e controles (204) de acordo com a presença ou não da DRD. Para que fossem incluídos neste estudo, os pacientes no grupo de controles deveriam ter o diabetes há no mínimo 5 anos. O DNA foi extraído de leucócitos do sangue periférico por um método de “salting out” e o polimorfismo rs2910164 C>G no gene do miR-146a foi identificado por meio de PCR em tempo real, utilizando-se “primers” e sondas de hidrólise contidos em ensaio comercial de discriminação alélica específico para a genotipagem desta variante. As frequências gênicas e genótípicas foram comparadas entre os casos e controles por meio do teste de qui-quadrado no pacote SPSS ou no WinPEPI.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Tabela 1: Caracterização demográfica e clínica dos pacientes com diabetes mellitus tipo 2

|                          | Sem DRD (n=204)  | Com DRD (n=163)   | p      |
|--------------------------|------------------|-------------------|--------|
| Sexo masculino           | 71 (34,8%)       | 100 (61,3%)       | <0,001 |
| Idade (anos)             | 62 ± 9           | 62 ± 9            | 0,945  |
| Tempo de diabetes (anos) | 15 ± 6           | 17 ± 9            | 0,037  |
| IMC (kg/m <sup>2</sup> ) | 28,4 ± 5         | 27,9 ± 5          | 0,335  |
| Hipertensão              | 141 (70,5%)      | 106 (84,1%)       | 0,008  |
| Uso de insulina          | 63 (33,3%)       | 98 (63,2%)        | <0,001 |
| Creatinina (mg/dL)       | 0,91 (0,50-2,20) | 4,04 (0,60-13,90) | <0,001 |
| Colesterol HDL (mg/dL)   | 46 ± 11          | 41 ± 13           | <0,001 |

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

Como demonstrado na Tabela 1, o grupo de controles tem maior prevalência de hipertensão e sendo em sua maioria composto por mulheres. O grupo com a doença renal do diabetes demonstra a maior parte sendo do sexo masculino; níveis de creatinina mais elevados e maior frequência no uso de insulina, o que pode estar correlacionado com estágios mais avançados de DM2 e comprometimento renal.

As frequências genótípicas e alélicas encontradas nos controles não foram estatisticamente diferentes daquelas encontradas no grupo de casos. (Tabela 2).

Tabela 2: As frequências genótípicas entre os grupos sem DRD e com DRD

|    | Controles (n=204) | Casos (n=163) | p     |
|----|-------------------|---------------|-------|
| GG | 125 (61,3%)       | 96 (58,9%)    | 0,806 |
| CG | 66 (32,3%)        | 54 (33,1%)    |       |
| CC | 13 (6,4%)         | 13 (8,0%)     |       |
| G  | 77,5%             | 75,5%         | 0,586 |
| C  | 22,5%             | 24,5%         |       |

Os estudos relacionados ao polimorfismo rs2910164 mostram resultados bastante dispersos tratando-se do alelo de interesse do estudo. A provável causa disso são grupos diferentes de patologia, assim como etnias distintas. O alelo C está significativamente associado à retinopatia diabética e também à nefropatia diabética em uma população caucasiana (KAIDONIS et al., 2016). Assim como a nefropatia causada por IgA (IgAN), LIN et al. (2014) e YANG et al. (2015) corroboraram que não existe associação do polimorfismo no gene do do miRNA-146a em populações chinesas; entretanto, o polimorfismo estava correlacionado com a idade de início da IgAN. Em 2016, um estudo feito por QU et al.(2016) chegou à conclusão que rs2910164 não está associado com a incidência de derrame cerebral na população chinesa; porém, pode ser um preditor de prognóstico da isquemia, pois o genótipo GG aumentava significativamente o risco recorrência do derrame.

Assim, os dados obtidos até o momento não indicam associação entre o polimorfismo rs2910164C>G no gene do miR-146a e a doença renal do diabetes em pacientes com DM2.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes - 2015. *Diabetes Care*, v. 38, s. 1, 2015.
- BAER C., CLAUS R., PLASS C. Genome-wide epigenetic regulation of miRNAs in cancer. Chicago: *Cancer Research*. v. 73, n. 2, p. 473-477, Jan 2013.
- BARTEL, DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cambridge: *Cell*. v. 136, n. 2, p. 215-233, Jan 2009.
- CANANI L., CAPP C., CHOO S., MAIA A., NABINGER G., SANTOS K., CRISPIM D., ROISENBERG I., KROLEWSKI A., GROSS J. The fatty acid-binding protein-2 A54T polymorphism is associated with renal disease in patients with type 2 diabetes. *New York: Diabetes* v. 54, n.11, p. 3326-3330, Nov 2005.

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.

FORBES JOURNAL MAGAZINE. Mechanisms of diabetic complications. Washington: *Physiology Reviews* v. 93, n. 1, p. 137-188, Jan 2013.

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.

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

KAIDONIS, G. et al. A single-nucleotide polymorphism in the MicroRNA - 146a gene is associated with diabetic nephropathy and sight-threatening diabetic retinopathy in Caucasian patients. *Acta Diabetologica*, 2016.

KIM V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Boston: *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* v. 6, n. 5, p. 376-385, Mai 2005.

LIM A. Diabetic nephropathy – complications and treatment. Auckland: *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease* v. 7, n.15, p. 361-381, Out 2014.

LIN, J. et al. Association of miR-146a rs2910164 with childhood IgA nephropathy. *Pediatric Nephrology*, v. 29, n. 10, p. 1979–1986, 2014.

LORENZEN, J. et al. MicroRNAs in diabetes and diabetes-associated complications. Georgetown: *RNA Biology.* v. 9, n. 6, p.:820-827, Jun. 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.

MUREA M, MA L, FREEDMAN B. Genetic and environmental factors associated with type 2 diabetes and diabetic vascular complications. Duisburg: *The Review of Diabetic Studies.* v. 9, n. 1, p. 6-22, 2012.

NATAJARAN 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.

QU JY et al. Association of the MicroRNA-146a SNP rs2910164 with Ischemic Stroke Incidence and Prognosis in a Chinese Population. *Int J Mol Sci*, v. 17, n. 5, 2016.

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.

ROMÃO J. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. Rio de Janeiro: *Jornal Brasileiro de Nefrologia* v. 26, p. 1-3, 2004.

ROMÃO J. A doença renal crônica: do diagnóstico ao tratamento. Rio de Janeiro: *Revista Prática Hospitalar* v. 9, p. 183-187, 2007.

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.

SANTOS K, CRISPIM D, CANANI L, FERRUGEM P, GROSS J, ROISENBERG I. Association of eNOS gene polymorphisms with renal disease in Caucasians with type 2 diabetes. Amsterdam: *Diabetes Research and Clinical Practice* v. 91, n.3, p.353-362, Mar 2011.

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

SRIVASTAVA K, SRIVASTAVA A. Comprehensive review of genetic association studies and meta-analyses on miRNA polymorphisms and cancer risk. San Francisco: *PLoS One* v. 7, n. 11, e50966, Nov 2012.

WANG, T. T. et al. Affection of single-nucleotide polymorphisms in miR-27a, miR-124a, and miR-146a on susceptibility to type 2 diabetes mellitus in Chinese han people. *Chinese Medical Journal*, v. 128, n. 4, p. 533–539, 2015.

WU et al. The Role of MicroRNAs in Diabetic Nephropathy. *Journal of diabetes research*, v. 2014, p. 1–12, 2014

YANG, B. et al. Genetic variation in miR-146a is not associated with susceptibility to IgA nephropathy in adults from a Chinese Han population. *Plos One*, v. 10, n. 10, p. e0139554, 2015.

ZAMPETAKI et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. Baltimore: *Circulation Research* v. 107, n. 6, p. 810-817, Set 2010.

ZHOU et al. A potentially functional polymorphism in the regulatory region of let-7a-2 is associated with an increased risk for diabetic nephropathy. Amsterdam: *Gene* v. 527, n.2, p. 456-461, Set 2013.