# ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO RS1617640 NO GENE DA ERITROPOETINA COM A RETINOPATIA DIABÉTICA

Renan Cesar Sbruzzi[1]
Evelise Regina Polina[2]
Luis Fernando Sesti[3]
Daisy Crispim[4]
Kátia Gonçalves dos Santos[5]

**Resumo**

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação microvascular comum do diabetes mellitus que, em estágio avançado, pode causar a perda de visão. A eritropoetina (EPO) é uma glicoproteína que age como hormônio de crescimento e também como fator angiogênico. Esta molécula é expressa na retina e seus níveis séricos assim como polimorfismos em seu gene já foram associados com a RD. O presente estudo avaliou a associação do polimorfismo rs1617640 no gene da EPO com a presença de RD e sua gravidade em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Foram selecionados para o estudo 693 pacientes com DM2 divididos entre casos e controles de acordo com a presença ou não de RD (411com RD e 282 sem RD). Entre os pacientes com RD, 246 tinham RD não-proliferativa e 165 apresentaram a forma proliferativa da doença. O polimorfismo de estudo foi identificado por meio de PCR em tempo real, utilizando ensaio comercial específico para a genotipagem desta variante. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre casos e controles por meio do teste de qui-quadrado no pacote estatístico SPSS ou no WinPEPI. As frequências genotípicas e a frequência do alelo C entre os grupos sem RD, com RD não-proliferativa e com RD proliferativa não foram estatisticamente diferentes (TT=42,9%; TG=46,8%; GG=10,3%; TT=46,8%; TG=44,7%; GG=8,5%; e TT=39,4%; TG=49,1%; GG=11,5%, respectivamente, p=0,627; e alelo T=0,66; 0,69 e 0,64, respectivamente, p=0,293). Os dados obtidos até o momento indicam que não há associação entre o polimorfismo rs1617640 no gene da EPO e a RD ou sua gravidade em pacientes com DM2.
**Palavras chave**: EPO; SNP; RD; Diabetes mellitus.

## INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um conjunto de distúrbios metabólicos de etiologia multifatorial, caracterizado por hiperglicemia, decorrente de defeitos na secreção de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer apropriadamente seus efeitos, alterando o metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES [SBD], 2015; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION [ADA], 2016). O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é um grave problema de saúde pública a nível mundial devido a sua crescente prevalência, morbidade e mortalidade elevadas e às implicações socioeconômicas decorrentes de suas complicações vasculares, que comprometem a qualidade de vida e a produtividade dos

1Graduando do Curso de Biomedicina/ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS – renansbruzzi@hotmail.com
2 Pós doutoranda do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde (PPGBioSaúde)/ULBRA – Bolsista PNPD/CAPES
3 Doutorando do PPG BioSaúde/ULBRA
4Professora do PPG em Endocrinologia/UFRGS
5Professora do curso de Biologia e do PPGBioSaúde/ULBRA – kgsantos2010@gmail.com

indivíduos afetados, além dos custos do seu tratamento (OLIVEIRA, 2004; YAU et al. 2012).

A retinopatia diabética (RD) é uma das principais complicações microvasculares do DM, afetando mais de 60% dos pacientes com DM2. A RD se caracteriza por alterações progressivas na microvasculatura da retina, que se manifestam por meio de hemorragias retinianas, exudatos, edema, isquemia ou infarto devido a distúrbios vasculares locais e sistêmicos que, ao atingirem sua forma mais grave, o estágio proliferativo, podem resultar na perda irreversível da visão (FONG et al., 2004; SIVAPARASAD et al.,2012; SBD, 2015;). Na etapa inicial da RD, ocorre a degeneração seletiva dos pericitos (células intramurais do capilar retiniano) e o espessamento da membrana basal. Consequentemente, 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 (AGHARD, 2004; SIVAPARASAD et al.,2012; ANTONETTI, 2012; TARR et al., 2013).

A eritropoetina (EPO) é uma glicoproteína que age como hormônio decrescimento cuja principal função fisiológica é a indução da eritropoiese. Evidências demonstram, entretanto, efeitos não-eritróides da eritropoetina, visto que receptores para esta molécula são expressos em vários tecidos não-eritróides, como o coração, endotélio, rim, tecido adiposo e células beta pancreáticas. (SHAH et al., 2015). A eritropoetinaexerce também um importante papel na angiogênese em condições tanto fisiológicas como patológicas e concentrações elevadas desta proteína no corpo vítreo estão fortemente associadas com a RD proliferativa em humanos. A eritropoetina pode desempenhar um papel duplo na patogênese da RD: nos estágios iniciais, pode exercer um efeito neuroprotetor, reduzindo o protegendo o aumento de permeabilidade induzido pela hiperglicemia no epitélio pigmentar da retina. Em estágios avançados da doença, no entanto, age sinergicamente com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) estimulando a angiogênese e o agravamento da RD. Portanto, estudos são necessários para esclarecer este papel duplo da eritropoetina na patogênese da RD (WATANABE et al., 2005; SIMO-SERVAT et al., 2013).

Os níveis séricos de eritropoetina foram relacionados ao aumento do risco para RD proliferativa em um estudo realizado por Gholamhossein et al. (2014) no Irã. Foram avaliados 180 pacientes com DM2 entre 40 e 79 anos de idade. Exames clínicos e sorológicos foram realizados e os resultados indicaram que os níveis plasmáticos de

eritropoetina eram maiores no grupo com RD proliferativa em comparação ao grupo sem RD. Um dos principais estudos que identificou uma associação entre os polimorfismos do gene da eritropoetina e a RD foi realizado por Abhary et al. (2010) em uma população envolvendo 751 australianos (173 diabéticos tipo 1, 345 diabéticos tipo 2 e 604 controles). Todos os 3 SNPs do gene da eritropoetina (rs507392, rs1617640 e rs551238) estavam associados com a RD nos portadores de DM1 e DM2, tanto quando analisados isoladamente como combinados na análise multivariada, sendo que o haplótipo GCC foi associado à RD. Todos os SNPs e o haplótipo GCC também foram associados com edema macular e RD proliferativa.

Os polimorfismos estudados no estudo descrito acima são responsáveis por variações fenotípicas associadas a várias doenças e complicações e podem alterar a expressão da eritropoetina (TONG et al, 2008). O entendimento do papel de polimorfismos em genes que codificam produtos determinantes na fisiopatologia da RD, como a eritropoetina, pode contribuir na identificação de indivíduos suscetíveis às complicações diabéticas, auxiliando no diagnóstico precoce e melhor prognóstico. Desta forma, o presente estudo tem o objetivo de avaliar a relação do polimorfismo rs1617640 no gene da eritropoetina com a presença de retinopatia diabética e sua gravidade em pacientes ambulatoriais com DM2.

## METODOLOGIA

Foram selecionados para este estudo de caso-controle 693 pacientes com diagnóstico de 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=411) ou controles (n=282) 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. A presença de RD foi avaliada por meio do exame de fundoscopia direta após dilatação pupilar, e classificada, considerando o olho mais gravemente afetado, como: ausente, RD não-proliferativa ou RD proliferativa, de acordo com as alterações presentes. Os pacientes participantes deste estudo realizaram exames clínicos, laboratoriais e uma entrevista (por meio de questionário padronizado, incluindo tempo de duração de DM, história de tabagismo e uso de medicamentos) e assinaram o termo de consentimento informado, cujo protocolo foi aprovado pelos comitês de ética de todas as instituições envolvidas. Para a realização das análises moleculares, o DNA foi extraído das células nucleadas do sangue periférico das amostras colhidas dos pacientes por meio de um método de *salting out* (LAHIRI, NURNBERGER Jr., 1991). O polimorfismo rs1617640 no gene daeritropoetinafoi identificado pela técnica de PCR em tempo real, utilizando-se *primers* e sondas de hidrólise contidos em um ensaio comercial de discriminação alélica específico para a genotipagem desta variante (TaqMan®, Life Technologies, Carlsbad, EUA).O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade das variáveis quantitativas. As variáveis contínuas foram comparadas entre os grupos de indivíduos

diabéticos pelo teste de Mann-Whitney. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de qui-quadrado ($\chi^2$). As frequências alélicas foram determinadas pela contagem direta e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado por meio do teste $\chi^2$. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre os grupos de indivíduos com o teste $\chi^2$. As análises estatísticas foram realizadas no SPSS (versão 18.0) e WinPEPI.

## RESULTADOS

As características clínicas e demográficas dos pacientes participantes do estudo estão expostas na Tabela 1 de acordo com a presença ou ausência da RD.

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

| | Sem RD (n=282) | Com RD (n=411) | p |
|---|---|---|---|
| Sexo Masculino (%) | 38,7 | 50,6 | 0,002 |
| Idade (anos) | 60±9 | 61±9 | 0,057 |
| Tempo de DM (anos) | 13±7 | 15±9 | <0,001 |
| Uso de Insulina (%) | 35,9 | 58,7 | <0,001 |
| IMC (Kg/m²) | 30±6 | 30±5 | 0,117 |
| Hipertensão (%) | 72,8 | 76,3 | 0,377 |
| HbA1 Total (%) | 7±2 | 8±2 | 0,594 |
| Colesterol HDL (mg/dL) | 46±20 | 44±29 | 0,008 |
| Creatinina sérica (mg/dL) | 0,9(0,7-1,0) | 1,0(0,7-1,5) | <0,001 |
| DRD | 34,1 | 63,7 | <0,001 |

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão, mediana (percentis 25-75) ou porcentagem; IMC: índice de massa corporal; DRD: doença renal do diabetes.

Os grupos caso e controle apresentaram valores aproximados quanto à faixa etária, índice de massa corporal, hipertensão e dosagens de glicohemoglobina (HbA1). Os pacientes com RD apresentaram maior frequência no uso de insulina e de doença renal do diabetes, reflexo da evolução fisiopatológica do DM.

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

A Tabela 3 expõe as frequências genotípicas e alélicas obtidas nos grupos de pacientes sem RD, com RD não-proliferativa e com RD proliferativa, estratificados para análise da associação do polimorfismo rs1617640 com a gravidade da doença.

**Tabela 2: Frequências genotípicas e alélicas obtidas nos grupos caso e controle**

| | Controle (n=282) | Casos (n=411) | p |
|---|---|---|---|
| TT | 121 (42,9%) | 180 (43,8%) | |
| TG | 132 (46,8%) | 191 (46,5%) | 0,958 |
| GG | 29 (10,3%) | 40 (9,7%) | |
| T | 0,65 | 0,67 | 0,825 |
| G | 0,35 | 0,33 | |

**Tabela 3: Frequências genotípicas e alélicas obtidas para os indivíduos sem RD, com RD não-proliferativa e RD proliferativa**

| | Sem RD (n=282) | RD não-proliferativa (n=246) | RD proliferativa (n=165) | p |
|---|---|---|---|---|
| TT | 121 (42,9%) | 115 (46,8%) | 65 (39,4%) | |
| TG | 132 (46,8%) | 110 (44,7%) | 81 (49,1%) | 0,627 |
| GG | 29 (10,3%) | 21 (8,5%) | 19 (11,5%) | |
| T | 0,66 | 0,69 | 0,64 | 0,293 |
| G | 0,34 | 0,31 | 0,36 | |

## DISCUSSÃO

Como apresentado nas Tabelas 2 e 3, as comparações das frequências genotípicas 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 rs1617460 com a presença de retinopatia diabética ou com sua gravidade.

A EPO é uma citocina que estimula a proliferação, migração e angiogênese em células endoteliais vasculares. O polimorfismo rs1617640 localiza-se 1.125 pb a montante do sítio de início da transcrição no gene da EPO, evidenciando o potencial do gene e do polimorfismo estudados a desempenharem um papel na fisiopatologia da RD.Um estudo publicado por TONG e colaboradores(2008) demonstrou,através da análise computacional, que a presença do alelo T cria um sítio de ligação para os *enhancers*EVI1/MEL1 e/ou AP1, sugerindo que este alelo aumentao risco de RD influenciando a expressão da proteína. As concentrações vítreas da EPO em indivíduos não diabéticos portadores do genótipo TT apresentaram-se 7,5 vezes maiores comparados com pacientes com genótipo GG. O alelo T aumentou, também, a expressão gênica em 25 vezes, comparado ao alelo G em um ensaio funcional *in vitro*. Esse aumento na atividade do promotor deve-se à criação de um sítio de ligação aos *enhancers* EVI1/MEL1 ou AP1 pela presença do alelo T, visto que a substituição do alelo T por outras bases (C ou A) apresentou acentuada diminuição na expressão gênica (TONG et al., 2008).

Diversos estudos apontaram associação do polimorfismo rs1617640 com a RD e/ou RD proliferativa em pacientes com DM2 (ABHARY et al., 2010; FAN et al.,2016; SONG et al., 2015; TONG et al., 2008). Os resultados obtidos neste estudo, entretanto, estão em concordância com a metanálise publicada por HOSSEINI (2015), onde foram analisados dados de 2.572 pacientes com DM2 e não foi observada associação entre o polimorfismo rs1617640 e a presença de RD ou seus estágios de gravidade. Semelhante resultado foi observado quando critérios clínicos como tempo mínimo de DM em casos e controles foram nivelados aos utilizados em estudos anteriores que reportaram associação.

Um estudo realizado em modelo animal (CHEN et al., 2008) sugeriu que o aumento da secreção intraocular de EPO durante a RD pode ser considerado um mecanismo compensatório, tendo sua produção acentuada a fim de reparar os danos causados pela hiperglicemia ao invés de exercer um papel patológico na RD. Estudos anteriores descrevem, no entanto, o papel da função angiogênica da EPO na fisiopatologia da RD (WATANABE et al., 2005; SIMO-SERVAT et al., 2013).

Visto que características genéticas individuais expressas por indivíduos em patologias complexas interagem entre si e com fatores ambientais, as variações nos resultados reportados acerca do envolvimento de polimorfismos no gene da EPO com a RD evidenciam a importância da identificação de fatores de risco genéticos específicos em diferentes populações. Embora o alelo de risco (T) apresenta frequências semelhantes entre pacientes de etnias européias, asiáticas e africanas, os resultados obtidos em nosso estudo estão limitados a um grupo étnico específico (brasileiros caucasianos), de maneira que podem não ser replicáveis em populações de diferentes ascendências.

Os resultados obtidos em nosso estudo indicam, por fim, que o polimorfismo rs1617640 não está associado com a suscetibilidade ou a gravidade da RD em pacientes brasileiros com DM2. Os mecanismos biológicos das variantes gênicas da EPO na RD ainda não estão completamente elucidados, de maneira que são necessários mais estudos com populações de diferentes etnias, assim como análises funcionais desta e outras variantes.

## REFERÊNCIAS


ABHARY, S.; BURDON, K.P.; CASSON, R.J., et al. Association between erythropoietin gene polymorphisms and diabetic retinopathy. **Archives Ophtalmology**, v.128, n.1, p. 102-6, 2010.

AGARDH E.; AGARDH C.D. **Diabetic retinopathy**. In: De Fronzo RA, Ferrannini E, Keen H, Zimmet P (eds) International Textbook of Diabetes Mellitus (2004) 4ª ed. John Wiley & Sons, West Sussex, p. 1187-1206.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Diagnosis and classification of diabetes mellitus**. New York: Diabetes Care, v.39, S1-2, 2016.

ANTONETTI D.A.; KLEIN R.; GARDNER T.W. Diabetic retinopathy. Boston: **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 13, p. 1227-39, 2012.

CHEN, J.; CONNOR, K.M.; ADERMAN, C.M., et al. Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. **Journal of Clinical Investigation**,v.118, p. 526–33, 2008.

FAN, Y.; FU, Y.; CHEN,Z., et al. Gene–gene interaction of erythropoietin gene polymorphisms and diabetic retinopathy in Chinese Han. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n 3, p. 1524-30, 2016.

FONG, D.S.; AIELLO, L.; GARDNER, T., et al. Retinopathy in diabetes. **Diabetes**

**Care,** v. 27, n. 1, p. 84-7, 2004.

GHOLAMHOSSEIN, Y.; BEHROUZ, H.; ASGHAR, Z. Diabetic retinopathy risk factors: plasma erythropoietin as a risk factor for proliferative diabetic retinopathy. **Korean Journal of Ophthalmology**, v. 28, n. 5, p. 373-8, 2014.

HOSSEINI, S.M.; BORIGHT, A.P.; SUN, L., et al.. The association of previously reported polymorphisms for microvascular complications in a meta‐analysis of diabetic retinopathy. **Human Genetics**, v. 134, p. 247–57, 2015.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research,** v. 19, p. 5444, 1991.

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

SHAH, R.; Y.E., C.; WOO, M., et al. Erythropoietin and glucose homeostasis in women at varying degrees of future diabetic risk. **Journal of Diabetes and Complications**, v. 29, n. 1, p. 26-31, 2015.

SIMÓ-SERVAT, O.; HERNÁNDEZ, C.; SIMÓ, R. Genetics in diabetic retinopathy: current concepts and new insights. **Current Genomics,** v. 14, p. 289-99, 2013.

SONG, Q; ZHANG, Y.; WU, W., et al. Association of erythropoietin gene polymorphisms with retinopathy in a Chinese cohort with type 2 diabetes. **Clinical & Experimental Ophthalmology,** v. 43, n. 107, p. 544-49, 2015.

SIVAPRASAD, S.; GUPTA, B.; CROSBY-NWAOBI, R., EVANS, J. Prevalence of diabetic retinopathy in various ethnic groups: a worldwide perspective. **Survey of Ophthalmology,** v. 57, n. 4, p. 347-70, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**.São Paulo: AC Farmacêutica, 2015.

TARR, J.M.; KAUL, K.; CHOPRA M., et al. Pathophysiology of Diabetic Retinopathy. **ISRN Ophtalmology**, v. 15, n. 1, p. 343-60, 2013.

TONG, Z.; YANG, Z.; PATEL, S. et al. Promoter polymorphism of the erythropoietin gene in severe diabetic eye and kidney complications. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA,** v. 105, n. 19, p. 6998-7003, 2008.

YAU, J.W., ROGERS, S.L., KAWASAKI, R., et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. **Diabetes Care,** v. 35, n. 3, p. 556–64, 2012.

WATANABE, R.M.; BLACK, M.H.; XIANG, A.H., et al. Genetics of gestational diabetes mellitus and type 2 diabetes. **Diabetes Care,** v. 30, S134-40, 2007.