



MICRORNA-155 E RETINOPATIA DIABÉTICA: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs767649

Fernando Marques de Oliveira¹
Evelise Regina Polina²
Daisy Crispim³
Kátia Gonçalves dos Santos⁴

Resumo

A retinopatia diabética (RD) é uma das principais complicações crônicas do diabetes mellitus tipo 2 (DM2), e compõe a principal causa não-traumática de novos casos de cegueira em países ocidentais. O microRNA-155 (miR-155) foi associado com o desenvolvimento e diferenciação de células B e T, e quando superexpresso, resulta na inflamação crônica. O presente estudo tem como objetivo avaliar a associação do polimorfismo rs767649 (T>A) no gene do miR-155 com a presença e a gravidade da RD nos pacientes com DM2. Foram incluídos 527 pacientes diagnosticados com DM2, além de 67 doadores de sangue sem histórico pessoal ou familiar de diabetes. O DNA foi extraído de leucócitos do sangue periférico utilizando-se o método *salting out*. Os genótipos do polimorfismo rs767649 no gene do miR-155 foram determinados pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Os resultados encontrados no presente estudo mostram uma possível associação do alelo A com a RD, pois foi observada uma maior frequência desse alelo nos pacientes com essa complicação em comparação aos pacientes sem RD (RDNP 0,09 e RDP 0,10 contra 0,06 dos sem RD, respectivamente, $p = 0,044$).

Palavras-chave: diabetes mellitus, retinopatia diabética, microRNA, SNP

INTRODUÇÃO

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação microvascular decorrente do diabetes, que se caracteriza por alterações gradualmente progressivas na microvasculatura retiniana, podendo resultar na perda irreversível da visão. A RD pode ser classificada em

¹Graduando Ciências Biológicas/ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS – (ulbra.oliveira@gmail.com)

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

³Professora do PPG em Endocrinologia/UFRGS

⁴Professora do curso de Biologia e PPGBioSaúde/ULBRA (kgsantos2010@gmail.com)

diferentes estágios de acordo com a gravidade das alterações na vasculatura da retina (CHISTIAKOV, 2011). A classificação mais simples agrupa a RD em três categorias: ausente (sem RD), não-proliferativa (RDNP; presença de microaneurismas, hemorragias retinianas, edema retiniano e exsudatos duros) e proliferativa (RDP; (neovascularização no disco óptico ou em outras regiões) (WILKINSON et al., 2003; CHISTIAKOV, 2011).

Os microRNAs (miRs) são pequenos RNAs endógenos capazes de regular a expressão gênica em um nível pós-transcricional através da degradação ou inibição de seus genes-alvo. O grau de complementariedade das sequências possui uma vasta variação permitindo que um único miR possa atingir diversos mRNAs, regulando múltiplos genes, e cada mRNA pode ser regulado por vários miRs (FILIPOWICZ et al., 2008; McCLELLAND; KANTHARIDIS, 2014). Considerando que os miRs 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.

O número e alvos dos miRs são tantos que, eles estão envolvidos na patogênese e desenvolvimento de muitas doenças, incluindo a RD (YANG et al., 2015). Variantes genéticas em miRs têm atraído mais e mais atenção nesses últimos anos por causa de sua capacidade de alterar as funções e/ou expressão dos mesmos, conseqüentemente afetando os vias biológicas e risco da doença. O polimorfismo rs767649, localizado no promotor do gene do miR-155 foi recentemente reportado como sendo capaz de alterar a atividade transcricional do miR-155 (WANG et al., 2016). O miR-155 é codificado por um gene que se localiza no cromossomo 21, tendo expressão nos órgãos linfoides. Ele está associado com o desenvolvimento e diferenciação das células B e T, sendo que sua superexpressão resulta na inflamação crônica (XIAOYAN et al., 2017).

O presente estudo tem como objetivo avaliar a associação do polimorfismo rs767649 (T>A) no gene do miR-155 com a presença e a gravidade da RD nos pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

METODOLOGIA

Foram elegíveis para o presente estudo de caso-controle os pacientes com diagnóstico de DM2, atendidos nos ambulatórios dos Serviços de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) ou do Hospital Nossa Senhora da Conceição (Porto Alegre/RS). A presença de RD foi avaliada por meio da fundoscopia direta após dilatação pupilar e classificada como ausente, RDNP ou RDP (WILKINSON et al., 2003). Neste estudo específico foram avaliados 234 pacientes sem RD, 161 com RDNP e 132 com RDP. Todos os

pacientes incluídos neste estudo realizaram exames clínicos, laboratoriais e uma entrevista (por meio de questionário, incluindo tempo de duração do diabetes, história de tabagismo e uso de medicamentos), após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), cujo protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com Seres Humanos do HCPA (CAAE: 35065914.9.0000.5327) e ratificado pelo CEP da ULBRA (CAAE: 5065914.9.3001.5349). Além disso, foram incluídos neste projeto, até o momento, 67 indivíduos doadores de sangue do HCPA, sem história pessoal ou familiar de diabetes, avaliados por meio de entrevista, que também autorizaram a sua inclusão no estudo por meio da assinatura do TCLE, constituindo a amostra de referência para a determinação da frequência do polimorfismo rs767649 no gene do miR-155 na população em geral. Os pacientes e doadores de sangue forneceram uma amostra de sangue venoso para as análises moleculares, e o DNA foi extraído de leucócitos do sangue periférico utilizando-se o método de *salting out* (LAHIRI; NURNBERGER Jr., 1991).

Os genótipos do polimorfismo rs767649 no gene do miR-155 foram determinados pela técnica da reação em cadeia da polimerase (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 (ensaio número C_2212229_10; TaqMan®, Life Technologies, Carlsbad, EUA). As reações de amplificação foram feitas em placas ópticas de 96 poços, em um volume total de 8 µL contendo 2 ng de DNA genômico, tampão de genotipagem (“Master Mix”) 1X e ensaio de genotipagem 1X. Os arquivos com os dados da fluorescência coletados durante a amplificação foram analisados com o software StepOne v2.3 (Life Technologies).

As comparações entre os grupos de indivíduos foram feitas no pacote estatístico SPSS (versão 18.0) e no WinPEPI. As frequências alélicas foram determinadas pela contagem direta dos alelos e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado por meio do teste de qui-quadrado. As diferenças nas distribuições gênicas e genotípicas entre os grupos de indivíduos foram avaliadas por meio do teste de qui-quadrado ou do teste exato de Fisher. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento, foram genotipadas 527 amostras de pacientes com DM2 e 67 de doadores de sangue. As frequências dos genótipos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo rs767649 em ambos os grupos. Os dados mostram que as frequências

dos genótipos foram similares nos pacientes e doadores, sendo que a frequência do alelo A foi idêntica nos dois grupos, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs767649 nos pacientes com DM2 e doadores de sangue

	Pacientes com DM2 (n = 527)	Doadores de Sangue (n = 67)	p
Genótipos			
TT	448 (85,0%)	56 (83,6%)	0,800
AT	76 (14,4%)	11 (16,4%)	
AA	3 (0,6%)	0 (0%)	
Alelos			
T	0,92	0,92	0,997
A	0,08	0,08	

As análises quanto à gravidade da RD (Tabela 2) mostram que as frequências dos genótipos foram diferentes entre os grupos, sendo que a frequência do alelo A foi maior nos pacientes com RD em comparação aos pacientes sem RD. Por meio da análise de regressão logística bivariada, usando o modelo dominante, verificou-se que o alelo A estava associado com a presença de RD (razão de chances = 1,89; IC 95% 1,14 -3,14; p = 0,014).

Tabela 2: Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs767649 nos pacientes com DM2 de acordo com a gravidade da RD

	Sem RD (n= 234)	RDNP (n= 161)	RDP (n = 132)	p
Genótipos				
TT	209 (89,3%)	134 (83,2%)	105 (79,5%)	0,041
AT	23 (9,8%)	26 (16,2%)	27 (20,5%)	
AA	2 (0,9%)	1 (0,6%)	0 (0%)	
Alelos				
T	0,94	0,91	0,90	0,044
A	0,06	0,09	0,10	

Atualmente há diversos estudos que evidenciam algumas das funções exercidas pelo miR-155 em diversas doenças. Um estudo recente mostrou que os níveis do miR-155 no grupo RDNP e no grupo RDP foram mais altas do que no grupo sem RD (p < 0,05 nos dois

casos) (YANG et al, 2015). Apesar disso, o presente estudo é um dos primeiros a buscar uma relação entre a RD e o polimorfismo rs767649 no gene do miR-155. Em relação à frequência do alelo A nos doadores de sangue, encontramos resultados semelhantes a um estudo realizado com um grupo populacional europeu (0,04) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=767649).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos dados mostrou uma possível associação do alelo A com o desenvolvimento da RD, sendo observada uma maior frequência desse alelo nos pacientes com essa complicação em comparação aos pacientes sem RD. Porém, ressaltamos que é necessária a genotipagem de mais amostras, bem com a realização de uma análise multivariada.

REFERÊNCIAS

- CHISTIYAKOV, D.A. Diabetic retinopathy: Pathogenic mechanisms and current treatments. **Diabetes & Metabolic Syndrome**. v. 5, n. 3, p. 165-172, 2011.
- FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S.N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nature Reviews Genetics**. v. 9, p. 102–114, 2008.
- LARIHI, D.K.; NURNBERGER, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLPs studies. **Nucleic Acids Research**. v. 19, p. 5444, 1991.
- McCLELLAND, A.D.; KANTHARIDIS, P. MicroRNA in the development of diabetic complications. **Clinical Sciences**. v. 126, p. 95-110, 2014.
- WANG, S.; CAO, X.; DING, B.; CHEN, J.; CUI, M.; XU, Y.; LU, X.; ZHANG, Z.; HE, A.; JIN, H. The rs767649 polymorphism in the promoter of miR-155 contributes to the decreased risk for cervical cancer in a Chinese population. **Gene**. v. 595, p. 109-114, 2016.
- WILKINSON, C.P.; FERRIS, F.L 3rd.; KLEIN, R.E.; LEE, P.P.; AGARDH, C.D.; DAVIS, M.; DILLS, D.; KAMPIK, A.; PARARAJASEGARAM, R.; VERDAGUER, J.T. Global Diabetic Retinopathy Project Group. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. **Ophthalmology**. v. 110, p.1677-1682, 2003.
- XIAOYAN, W.; PAIS, E.M.; LAN, L.; JINGRUI, C.; LIN M.; FORDJOUR, P.A.; GUANWEI, F. MicroRNA-155: a novel armamentarium against inflammatory diseases. **Inflammation**. v. 40, p. 708-716, 2017.
- YANG, T.T.; SONG, S.J.; XUE, H.B.; SHI, D.F.; LIU, C.M.; LIU, H. Regulatory T cells in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus retinopathy by miR-155. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. v. 19, p. 2010-2015, 2015.