

Estudo de associação do polimorfismo – 308G>A no Gene do fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) com a presença de retinopatia diabética

MARIANE HANKE GONÇALVES¹
JÉSSICA BOAVENTURA DOS SANTOS²
LUÍS FERNANDO CASTAGNINO SESTI³
DAISY CRISPIM⁴
KÁTIA GONÇALVES DOS SANTOS⁵

RESUMO

A retinopatia diabética (RD) é uma grave complicação do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) que pode levar à cegueira. O polimorfismo funcional –308G>A no gene do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) tem sido relacionado com as complicações crônicas do DM2 em alguns estudos, mas não em outros. Neste estudo, analisamos a relação do polimorfismo –308G>A no gene do TNF- α com a presença de RD em 232 pacientes com DM2. O polimorfismo foi identificado pela técnica de PCR-RFLP. As frequências genotípicas e alélicas obtidas nos pacientes com RD não diferiram significativamente daquelas observadas nos pacientes sem esta complicação ($p > 0,05$ para ambas as comparações). Assim, os dados indicam que o polimorfismo –308G>A não está associado com a presença da RD em pacientes com DM2.

Palavras-chave: Diabetes mellitus tipo 2, retinopatia diabética, TNF- α , polimorfismo.

¹ Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

² Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA – Bolsista FAPERGS

³ Aluno de Pós-Graduação do PPG Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA

⁴ Bióloga do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Professora colaboradora do Programa de Pós-Graduação em Endocrinologia/UFRGS

⁵ Professora – Orientadora do Curso de Biologia/ULBRA e do PPG Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA (kgsantos2001@hotmail.com)

ABSTRACT

Diabetic retinopathy (DR) is a severe chronic complication of type 2 diabetes mellitus (DM2) that can lead to blindness. The functional -308G>A polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) gene has been related to chronic complications of DM2 in some studies, but not in others. In this study, we analyzed the relationship of the -308G>A polymorphism in the TNF- α gene with the presence of DR in 232 patients with DM2. The polymorphism was identified by the technique of PCR-RFLP. The genotype and allele frequencies obtained in patients with DR did not differ significantly from those observed in patients without this complication ($p > 0.05$ for both comparisons). Thus, the data indicate that the -308G>A polymorphism is not associated with the presence of DR in patients with DM2.

Key words: Type 2 diabetes mellitus, diabetic retinopathy, TNF- α , polymorphism.

INTRODUÇÃO

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação vascular crônica do diabetes, que ocorre em mais de 50% dos pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), e se constitui na principal causa não-traumática de novos casos de cegueira em adultos. A RD se caracteriza por alterações gradualmente progressivas na microvasculatura da retina que, ao atingirem sua forma mais grave, podem resultar na perda irreversível da visão (FONG et al., 2004; ESTEVES et al., 2008). Embora a hiperglicemia sustentada e o longo tempo de DM sejam os principais determinantes da RD, estudos populacionais e familiares têm sugerido que o desenvolvimento e/ou o agravamento desta complicação dependem da interação de vários fatores genéticos e ambientais (ESTEVES et al., 2008; PATEL et al., 2008).

Além de contribuir para o desenvolvimento do DM2, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e outras moléculas que atuam no processo inflamatório parece desempenhar um papel crítico no desenvolvimento das complicações crônicas do DM (ADAMIS e BERMAN, 2008; KING, 2008). Vários estudos têm observado que os pacientes com RD apresentam níveis séricos (DOGANAY et al.,

2002) e vítreos (DEMIRCAN et al., 2006) de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) elevados.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que atua na regulação da proliferação celular, diferenciação e apoptose (ZHANG et al., 2009). Entre os vários polimorfismos descritos no gene do TNF- α , a variante -308G>A localizada na região promotora (WILSON et al., 1992) se destaca por afetar a expressão deste gene. A presença do alelo A no nucleotídeo -308 aumenta a transcrição do gene do TNF- α em aproximadamente duas vezes, elevando a produção desta citocina (ABRAHAM e KROEGER, 1999). Porém, os poucos estudos que investigaram a relação do polimorfismo -308G>A com a RD não encontraram qualquer evidência de associação entre estes dois fatores em japoneses (YOSHIOKA et al., 2006), suíços (KRAYENBUEHL et al., 2007) e escandinavos (LINDHOLM et al., 2008) com DM2.

Considerando a importância do TNF- α na patogênese do DM2 e suas complicações e a ausência de estudos sobre a relação de polimorfismos do gene do TNF- α com as complicações do DM no Brasil, o objetivo deste estudo é analisar a associação do polimorfismo -308G>A no gene do TNF- α com a presença de RD, em pacientes com DM2.

MATERIAL E MÉTODOS

População de Estudo

Para este estudo de caso-controle foram selecionados 232 pacientes com DM2, participantes de um estudo multicêntrico que teve início em 2002 e tem por objetivo investigar os fatores de risco genéticos associados com a predisposição ao DM e suas complicações crônicas (SANTOS et al., 2006; ERRERA et al., 2007). Todos os pacientes são caucasóides descendentes de europeus (principalmente de portugueses, espanhóis, italianos e alemães) e são atendidos regularmente nos ambulatórios dos Serviços de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e do Grupo Hospitalar Conceição (Porto Alegre/RS). Os pacientes foram classificados como casos ($n = 170$) ou controles ($n = 62$), de acordo com a presença ou ausência de RD, respectivamente. Além disso, os controles deveriam ter, no mínimo, 10 anos de DM para serem incluídos no estudo.

Avaliação Clínica dos Pacientes

O DM2 foi diagnosticado de acordo com os critérios preconizados pela Associação Americana de Diabetes (1997) e todos os pacientes avaliados neste estudo responderam a um questionário padronizado (incluindo questões sobre o tempo de duração do DM, história de tabagismo, uso de medicamentos e estilo de vida) e realizaram uma avaliação clínica e laboratorial, após a assinatura do termo de consentimento informado, cujo protocolo foi aprovado pelos comitês de ética das instituições participantes.

A pressão arterial foi medida duas vezes com intervalo de 10 min. na posição sentada, com esfigmomanômetro de coluna de mercúrio. A presença de hipertensão foi considerada positiva

quando a pressão arterial fosse $\geq 140/90$ mmHg e/ou se o paciente estava em uso de drogas anti-hipertensivas. A presença de RD foi avaliada por meio da fundoscopia direta após dilatação pupilar e foi classificada como: (1) ausente; (2) RD não-proliferativa (microaneurismas, hemorragia, exsudatos duros); ou (3) RD proliferativa (presença de neovasos e/ou tecido fibroso na cavidade vítrea). O diagnóstico de nefropatia diabética (ND) foi definido pelo aumento na excreção urinária de albumina (EUA) na ausência de infecção urinária ou outras anormalidades renais. A ND foi classificada em nefropatia incipiente (EUA 20-199 $\mu\text{g}/\text{min}$ ou 17-174 mg/L) ou ND clínica. A ND clínica foi definida pela presença de macroalbuminúria (EUA ≥ 200 $\mu\text{g}/\text{min}$ ou > 174 mg/L) ou pela presença de insuficiência renal crônica tratada com diálise quando outras causas de proteinúria ou doença renal foram afastadas. O diagnóstico de cardiopatia isquêmica foi baseado na presença de angina ou possível infarto segundo o questionário cardiovascular da Organização Mundial da Saúde, e/ou presença de alterações eletrocardiográficas e/ou presença de anormalidades perfusionais no exame de cintilografia miocárdica.

Avaliação Laboratorial

A EUA foi quantificada por meio da técnica de imunoturbidimetria em amostras de urina de 24h com tempo marcado (três amostras por paciente com 15 dias de intervalo). A presença de micro- ou macroalbuminúria foi confirmada por pelo menos duas medidas com intervalo de três a seis meses. Os níveis de glicose foram determinados pelo método da glicose oxidase, a creatinina pela reação de Jaffé, a glicohemoglobina pela técnica de HPLC – troca iônica (valores de referência: 4,7 – 6,0%), os triglicérides e os níveis de colesterol por métodos enzimáticos.

Análises Moleculares

As amostras de DNA foram encaminhadas ao Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Pesquisas em Ciências Médicas da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), para a realização das análises moleculares. Para a genotipagem do polimorfismo $-308G>A$ no gene do $TNF-\alpha$, as amostras de DNA foram amplificadas por PCR, utilizando-se “primers” e condições de amplificação específicos, como descrito na literatura (WILSON et al., 1992). Após a confirmação da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *NcoI*, segundo as instruções do fabricante (New England Biolabs Inc., Beverly, EUA). Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de poli-acrilamida 8%, corados com nitrato de prata e diretamente visualizados. Na presença do alelo G o fragmento amplificado de 107 pb permanece intacto, ao passo que na presença do alelo A o produto amplificado é clivado em dois fragmentos menores (87 pb e 20 pb).

Análise Estatística

As comparações entre os casos e controles foram realizadas utilizando-se o teste t de Student, para as variáveis normalmente distribuídas, ou teste de Mann-Whitney U, para as variáveis sem distribuição normal, usando o pacote estatístico SPSS (SPSS para Windows, versão 10.0). 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 distribuições gênicas e genotípicas entre os casos e controles foram avaliadas por meio do teste de qui-quadrado e do teste exato de Fisher. O teste de qui-quadrado também foi utilizado para a comparação das variáveis qualitativas entre os grupos de indivíduos. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta um resumo das características clínicas e laboratoriais dos pacientes com DM2, de acordo com a presença ou ausência de RD. Os pacientes com RD não diferiram dos indivíduos sem esta complicação em relação à idade, ao sexo e ao tempo de duração do DM. Porém, os pacientes com RD tinham uma prevalência maior de uso de insulina, nefropatia diabética e cardiopatia isquêmica, assim como apresentaram níveis mais elevados de creatinina e níveis mais reduzidos de colesterol HDL do que os pacientes sem RD.

Tabela 1 - Caracterização clínica dos pacientes com DM2 de acordo com a presença de RD.

	Controles (n = 62)	Casos (n = 170)	p
Idade (anos)	61,5 ± 8,3	60,0 ± 9,2	0,267
Homens (%)	41,9	54,7	0,116
Duração do DM2 (anos)	16,2 ± 5,5	14,9 ± 8,6	0,069
Hipertensão (%)	67,7	76,0	0,271
História de tabagismo (%)	52,5	45,2	0,413
Glico-hemoglobina (%)	6,2 ± 1,6	6,6 ± 1,8	0,090
Uso de insulina (%)	25,8	51,2	0,001*
Creatinina sérica (mg/dL)	0,8 (0,5-3,0)	0,9 (0,6-8,5)	0,005*
Colesterol total (mg/dL)	210 ± 38	216 ± 47	0,388
Colesterol HDL (mg/dL)	45 ± 12	41 ± 11	0,028*
Triglicerídeos (mg/dL)	145 (59-462)	158 (43-747)	0,480
Nefropatia diabética (%)	32,3	61,0	< 0,001*
Cardiopatia isquêmica (%)	36,2	53,7	0,042*

Os dados estão demonstrados como média ± D.P., mediana (amplitude), ou percentual. Os valores de p foram calculados utilizando-se os testes t de Student, Mann-Whitney U ou χ^2 . n = número de indivíduos. A história de tabagismo foi considerada positiva para fumantes atuais e ex-fumantes. * $p < 0,05$ para a comparação entre casos e controles.

As frequências genotípicas obtidas para o polimorfismo $-308G>A$ nos pacientes com RD não diferiram significativamente daquelas observadas nos pacientes sem esta complicação (Tabela 2), e

estavam de acordo com as esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos de pacientes. Da mesma forma, a frequência do alelo -308A foi similar entre os pacientes com ou sem RD (Tabela 2) e não diferiu da frequência encontrada em outras populações de origem caucasóide (LEE et al., 2005; KRAYENBUEHL et al., 2007; VISENTAINER et al., 2008). A ausência de associação do polimorfismo -308G>A no gene do TNF- α com a presença de RD observada no presente trabalho está de acordo com os resultados obtidos em japoneses (YOSHIOKA et al., 2006), suíços (KRAYENBUEHL et al., 2007) e escandinavos (LINDHOLM et al., 2008) com DM2.

Tabela 2 - Frequências genótípicas e alélicas obtidas para o polimorfismo -308G>A nos pacientes com DM2, de acordo com a presença de RD.

		Controles (n = 62)	Casos (n = 170)	ρ
Genótipos, n (%)	GG	50 (80,7)	129 (75,9)	0,647
	GA	11 (17,7)	35 (20,6)	
	AA	1 (1,6)	6 (3,5)	
Alelos	G	0,90	0,86	0,428
	A	0,10	0,14	

As comparações entre os casos e os controles foram feitas utilizando-se os testes de χ^2 ou exato de Fisher. n = número de indivíduos.

Desde que os estudos funcionais demonstraram que o polimorfismo -308G>A modula a expressão do gene do TNF- α (ABRAHAM e KROEGER, 1999), e que o aumento na expressão desta citocina contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina (KING, 2008) e da disfunção endotelial característica das complicações crônicas do DM2 (KERN, 2007; ADAMIS e BERMAN, 2008; KING, 2008), vários autores passaram a investigar a possível relação entre o polimorfismo -308G>A e o desenvolvimento de nefropatia diabética, com resultados bastante contraditórios (BURACZYNSKA et al., 2004; LEE et al., 2005; WANG et al., 2005; BABEL et al., 2006; KRAYENBUEHL

et al., 2007; PRASAD et al., 2007; LINDHOLM et al., 2008). Por outro lado, os poucos estudos que analisaram o papel deste polimorfismo na RD obtiveram resultados consensuais, apontando a ausência de associação entre o polimorfismo -308G>A e a presença desta complicação em pacientes com DM2 (YOSHIOKA et al., 2006; KRAYENBUEHL et al., 2007; LINDHOLM et al., 2008).

Uma possível explicação é que, talvez, o TNF- α não apresente um grande efeito na cascata de eventos que levam à disfunção endotelial que ocorre na RD, como outros mediadores inflamatórios, como a proteína C reativa e a interleucina-6 (KING, 2008). Além disso, com exceção do estudo de Lindholm et al. (2008) em escandinavos, os dois outros estudos prévios realizados com o intuito de investigar a associação entre o polimorfismo -308G>A e a RD foi constituído por apenas 76 (KRAYENBUEHL et al., 2007) e 251 (YOSHIOKA et al., 2006) pacientes com DM2. Considerando que este polimorfismo possa ter um efeito pequeno (mas significativo) no desenvolvimento da RD e que o alelo -308A apresenta uma baixa frequência na população, é plausível supor que os estudos realizados até o momento, incluindo o presente trabalho, careçam de poder estatístico suficiente para demonstrar tal relação. Por exemplo, o presente estudo apresentou um poder de aproximadamente 76% de detectar uma associação entre o alelo -308A e a RD com uma razão de chances (RC) de 2,5, mas apenas 49% de observar uma associação com RC = 2,0.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos não corroboram a hipótese de que o polimorfismo -308G>A no gene do TNF- α esteja relacionado com a presença da RD em pacientes com DM2. Porém, considerando o

tamanho amostral estudado até o momento, ainda não é possível avaliar adequadamente o papel deste polimorfismo na patogênese da RD.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente deste estudo e ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, L.J.; KROEGER, K.M. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *Journal of Leukocyte Biology*, v.66, n.4, p.562-566, 1999.

ADAMIS, A.P.; BERMAN, A.J. Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Seminars in Immunopathology*, v.30, n.2, p.65-84, 2008.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v.20, n.7, p.1183-1197, 1997.

BABEL, N. et al. Predictive value of cytokine gene polymorphisms for the development of end-stage renal disease. *Journal of Nephrology*, v.19, n.6, p.802-807, 2006.

BURACZYNSKA, K. et al. Genetic determination of TNF and myeloperoxidase production in dialyzed patients with diabetic nephropathy. *Renal Failure*, v.26, n.6, p.633-639, 2004.

DEMIRCAN, N. et al. Determination of vitreous

interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye*, v.20, n.12, p.1366-1369, 2006.

DOGANAY, S. et al. Comparison of serum NO, TNF-alpha, IL-1beta, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Eye*, v.16, n.2, p.163-170, 2002.

ERRERA, F.I.V. et al. Functional vascular endothelial growth factor -634G>C SNP is associated with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study in a Brazilian population of European ancestry. *Diabetes Care*, v.30, n.2, p.275-279, 2007.

ESTEVES, J. et al. Fatores de risco para retinopatia diabética. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v.52, n.3, p.431-441, 2008.

FONG, D.S. et al. Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care*, v.27, supl.1, p.S84-S87, 2004.

KERN, T.S. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Experimental Diabetes Research*, v.2007, artigo ID 95103, p.1-14, 2007.

KING, G.L. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *Journal of Periodontology*, v.79, n.8 (supl.), p.1527-1534, 2008.

KRAYENBUEHL, P.A. et al. TNF-alpha -308G>A polymorphism modulates cytokine serum concentrations and macrovascular complications in diabetic patients on aspirin. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, v.115, n.5, p.322-326, 2007.

LEE, S.H. et al. Genetics of diabetic nephropathy in type 2 DM: candidate gene analysis for

the pathogenic role of inflammation. **Nephrology**, v.10, supl., p.S32-S36, 2005.

LINDHOLM, E. et al. Association between LTA, TNF and AGER polymorphisms and late diabetic complications. **PloS One**, v.3, n.6, p.e2546, 2008.

PATEL, S. et al. Genetic susceptibility of diabetic retinopathy. **Current Diabetes Reports**, v.8, n.4, p.257-262, 2008.

PRASAD, P. et al. Association of TGF β 1, TNF α , CCR2 and CCR5 gene polymorphisms in type-2 diabetes and renal insufficiency among Asian Indians. **BMC Medical Genetics**, v.8, p.20, 2007 (doi: 10.1186/1471-2530-8-20).

SANTOS, K.G. et al. The -106CC genotype of the aldose reductase gene is associated with an increased risk of proliferative diabetic retinopathy in Caucasian-Brazilians with type 2 diabetes. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.88, n.3, p.280-284, 2006.

VISENTAINER, J.E. et al. TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in South

and Southeast Brazil. **International Journal of Immunogenetics**, v.35, n.4/5, p.287-293, 2008.

WANG, Y. et al. Association between tumour necrosis factor- α G-308A polymorphism and risk of nephropathy in obese Chinese type 2 diabetic patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.20, n.12, p.2733-2738, 2005.

WILSON, A.G. et al. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detected by NcoI restriction of PCR product. **Human Molecular Genetics**, v.1, n.5, p.353, 1992.

YOSHIOKA, K. et al. Relationship between polymorphisms 804C/A and 252A/G of lymphotoxin-alpha gene and -308G/A of tumor necrosis factor alpha gene and diabetic retinopathy in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism**, v.55, n.10, p.1406-1410, 2006.

ZHANG, H. et al. Role of TNF- α in vascular dysfunction. **Clinical Science**, v.116, Pt3, p.219-230, 2009.