

# **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 GONÇALVES<sup>1</sup>  
JÉSSICA BOAVENTURA DOS SANTOS<sup>2</sup>  
LUÍS FERNANDO CASTAGNINO SESTI<sup>3</sup>  
DAISY CRISPIM<sup>4</sup>  
KÁTIA GONÇALVES DOS SANTOS<sup>5</sup>

## **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- $\alpha$ ) 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- $\alpha$  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- $\alpha$ , polimorfismo.

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA – Bolsista FAPERGS

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

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

<sup>5</sup> 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- $\alpha$ ) 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- $\alpha$  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- $\alpha$ , 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- $\alpha$ ) elevados.

O TNF- $\alpha$  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- $\alpha$ , 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- $\alpha$  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- $\alpha$  na patogênese do DM2 e suas complicações e a ausência de estudos sobre a relação de polimorfismos do gene do TNF- $\alpha$  com as complicações do DM no Brasil, o objetivo deste estudo é analisar a associação do polimorfismo -308G>A no gene do TNF- $\alpha$  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  $\geq 200 \mu\text{g}/\text{min}$  ou  $> 174 \text{ mg}/\text{L}$ ) 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 triglicerídeos 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  $\chi^2$ . 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- $\alpha$  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)	$\rho$
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  $\chi^2$  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- $\alpha$  (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- $\alpha$  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- $\alpha$  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 $\beta$ 1, TNF $\alpha$ , 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- $\alpha$  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- $\alpha$  in vascular dysfunction. **Clinical Science**, v.116, Pt3, p.219-230, 2009.