

**SUZANA MARIA DE SOUZA VIEIRA**

**Estudo da associação entre polimorfismos em genes relacionados ao  
metabolismo da glutatona e a suscetibilidade a complicações  
microvasculares no diabete melito tipo 1**

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Endocrinologia  
Orientadora: Dra. Maria Lúcia C. Corrêa-Giannella

São Paulo  
2008

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Vieira, Suzana Maria de Souza

Estudo da associação entre polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo da glutatona e a suscetibilidade a complicações microvasculares no diabete melito tipo 1 / Suzana Maria de Souza Vieira. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientadora: Maria Lúcia C. Corrêa-Giannella.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 1/complicações 2.Estresse oxidativo  
3.Polimorfismo genético 4.Glutatona 5.Glutamato-cisteína ligase 6.Glutatona peroxidase

USP/FM/SBD-441/08

Aos meus pais, Maria Auxiliadora de Souza Vieira e  
Bento Vieira dos Santos (*in memorian*), pelo  
amor, dedicação e, sobretudo, pelo  
investimento incondicional na educação de  
todos os seus filhos

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua infinita graça em mostrar novos caminhos e permitir a conclusão de mais uma etapa na minha vida.

À minha orientadora, Dra. Maria Lúcia Corrêa-Giannella, Docente da FMUSP, por depositar em mim a sua confiança para o desenvolvimento de uma nova linha de pesquisa, e pela presença constante em todas as etapas do trabalho.

Aos portadores de diabetes, pela contribuição fundamental e irrestrita aos projetos de pesquisa.

Ao Adriano Diniz Costa, pelo amor, paciência e incentivo do início à conclusão desse trabalho.

À Maria Auxiliadora Higa, Ana Mercedes Carvalheiro Luna, Maria Ângela Fortes, Ricardo Giorgi, Sandra Sá, Norisa Herreira e demais profissionais e pós-graduandos do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular LIM-25 da FMUSP, pela contribuição nos ensaios laboratoriais e pela solução de tantos outros problemas.

Ao Dr. Luis Henrique Canani, Médico Assistente do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e à sua equipe de laboratório, pela imensa contribuição para o aumento da casuística.

Ao Dr. Hélio Primiano e André Barros, pela avaliação oftalmológica dos portadores de diabetes.

Aos neurologistas Dra. Cristiane Patroclo e Domingos Sávio Vieira, meu irmão, pela avaliação neurológica dos pacientes, ainda que não representada neste estudo.

Ao Dr. Sérgio Atala Dib, Médico Assistente do Centro de Diabetes da Universidade Federal de São Paulo, e ao Dr. Márcio Vendramini, Médico Assistente do Instituto de Assistência Médica do Servidor Estadual de São Paulo (Iamsp), pela colaboração na inclusão dos pacientes dos respectivos serviços.

À Equipe Médica do Diabetes do HCFMUSP, coordenada pela Dra. Márcia Neri, pelo cuidado dos pacientes e pelas sugestões dadas em todas as etapas da pesquisa.

À FAPESP, pelo auxílio pesquisa concedido.

À equipe de enfermagem do HCFMUSP e Iamsp, pela colaboração na coleta das amostras biológicas.

À Disciplina de Endocrinologia, representada pela Professora Titular Dra. Berenice Bilharino Mendonça, pelo apoio dado à apresentação dos resultados preliminares desse trabalho em congressos nacionais e internacionais, de inquestionável importância.

Aos secretários da Disciplina de Endocrinologia: Rubens, Márcia, Rosana e Cida, pela ajuda na conclusão das etapas burocráticas e administrativas de várias fases do trabalho.

À Adriana Ruiz, pela ajuda no contato de pacientes do estudo e organização da minha confusa agenda durante maior parte do período da pesquisa.

Aos meus irmãos: Graça, Conceição, Pedro, Glória, Auxiliadora, Marcelo, Marconi e Sávio, pela contribuição direta ou indireta na minha educação.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para o término desse trabalho.

***“The greater our knowledge increases,  
the greater our ignorance unfolds”***

*(“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,  
mais evidente fica nossa ignorância”)*

John F. Kennedy

(1917 -1963)

Essa tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*



## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas	
Lista de Símbolos	
Lista de Fórmulas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Epidemiologia do diabete melito .....	2
1.1.1 No mundo.....	2
1.1.2 No Brasil .....	2
1.2 Epidemiologia e fatores de risco para desenvolvimento das complicações diabéticas .....	3
1.2.1 Nefropatia diabética e doença renal crônica .....	4
1.2.2 Retinopatia diabética.....	6
1.3 Principais mecanismos implicado na patogênese das complicações crônicas	8
1.3.1 Aumento da ativação da via dos polióis.....	9
1.3.2 Aumento da formação dos AGEs.....	10
1.3.3 Aumento da ativação da proteína quinase C .....	10
1.3.4 Aumento da ativação da via da hexosamina .....	11
1.3.5 Estresse oxidativo.....	11
1.3.6 Superóxido dismutases e catalase .....	14
1.3.7 Sistema glutaciona .....	14
1.4 Estresse oxidativo e diabete melito .....	18
1.5 Genes candidatos para a microangiopatia diabética.....	20
1.6 Polimorfismos em genes associados à defesa antioxidante .....	26
1.6.1 Superóxido dismutases.....	26
1.6.2 Catalase .....	26
1.6.3 Sistema glutaciona .....	26
2 OBJETIVOS .....	33
3 MÉTODOS .....	35
3.1 Protocolo Clínico .....	36
3.2 Definição das complicações.....	38

3.2.1	Complicações renais.....	38
3.2.2	Retinopatia diabética.....	41
3.3	Genotipagem .....	41
3.3.1	Extração do DNA genômico .....	42
3.3.2	Reação em cadeia da polimerase.....	43
3.3.3	Genotipagem do gene GCLC.....	45
3.3.4	Genotipagem do gene GPX1.....	47
3.3.5	Genotipagem do gene GPX3.....	48
3.4	Análise estatística.....	50
4	RESULTADOS .....	52
4.1	Caracterização dos pacientes de acordo com a presença ou ausência das complicações estudadas .....	53
4.1.1	Complicações renais.....	53
	Análise de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética avançada.....	53
	Análise de acordo com o estágio da doença renal crônica .....	60
4.1.2	Análise de acordo com a presença ou ausência de retinopatia diabética proliferativa.....	63
4.2	Associação do polimorfismo no gene GCLC com o desenvolvimento de complicações crônicas .....	66
4.2.1	Complicações renais.....	69
4.2.2	Retinopatia diabética e polimorfismo no gene GCLC .....	75
4.3	Associação do polimorfismo no gene GPX1 com o desenvolvimento de complicações crônicas .....	76
4.3.1	Complicações diabéticas e polimorfismo no gene GPX1 .....	77
4.4	Associação do polimorfismo no gene GPX3 com o desenvolvimento de complicações crônicas .....	80
4.4.1	Complicações renais.....	83
4.4.2	Retinopatia diabética proliferativa e polimorfismo no gene GPX3 .....	87
4.5	Associação entre os haplótipos determinados pelas variantes alélicas nos genes GCLC e GPX3 e as complicações crônicas.....	88
5	DISCUSSÃO .....	90
6	CONCLUSÕES .....	103
7	REFERÊNCIAS.....	105

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs	Produtos avançados de glicação
ALA <sup>6</sup>	alelo do gene <i>GPXI</i> com 6 repetições de alanina
ARE	elemento responsivo a antioxidantes
BRA	bloqueador do receptor de angiotensina
CAT	catalase
COL	colesterol total
DAG	diacilglicerol
dATP	desoxiadenina trifosfatada
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
dCTP	desoxicitosina trifosfatada
dGTP	desoxiguanidina trifosfatada
DM	diabete melito
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	desvio-padrão
Dr.	doutor
DRC	doença renal crônica
dTTP	desoxitimidina trifosfatada
EAU	excreção de albumina urinária
EDIC	<i>Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
<i>et al</i>	e outros
EUA	Estados Unidos da América

F	feminino
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GCL	gama-glutamil cisteína sintetase
GCLC	subunidade catalítica da enzima gama glutamil cisteína sintetase
GFAT	glutamina: frutose-6-fosfato aminotransferase
GoKinD	<i>Genetics of Kidneys in Diabetes</i>
GPX	glutaciona peroxidase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
H2O miliQ	água destilada e deionizada
HAS	hipertensão arterial sistêmica
Hb	hemoglobina
HbA1C	fração C da hemoglobina glicada A1
HDL-c	lipoproteína de alta densidade do colesterol
HIF-1	fator induzido por hipóxia-1
HPLC	cromatografia líquida de alta <i>performance</i>
Iamsp	Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual de São Paulo
IC	intervalo de confiança
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IECA	inibidor da enzima conversora da angiotensina
IMC	índice de massa corpórea

KDOQI	<i>Kidney Disease Outcomes Quality Initiative™</i>
M	masculino
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
med	mediana
min	Minuto
MRE	elemento responsivo a metal
MRE	elemento responsivo a metal
n	tamanho da amostra
N $\kappa$ $\beta$	fator nuclear $\kappa$ B
NADP	nicotinamida adenina difosfato
NADPH	nicotinamida adenina difosfato reduzida
ND	nefropatia diabética
NGSP	<i>National Glyco Hemoglobin Standardization Program</i>
NS	não significativo
OR	<i>Odds Ratio</i> (Razão de chance)
PAD	pressão arterial diastólica
PAI-1	inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
PAS	pressão arterial sistólica
pb	pares de bases
PCR	reação de polimerização em cadeia
PKC	proteína quinase C
RAGE	receptor dos produtos finais de glicação avançada
RD	retinopatia diabética

RDNP	retinopatia diabética não proliferativa
RDP	retinopatia diabética proliferativa
RFG	ritmo de filtração glomerular
RFGe	ritmo de filtração glomerular estimado
RFLP	polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
SDS	sódio dodecil sulfato
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de um único nucleotídeo)
SOD1	cobre-zinco-superoxido dismutase
SOD2	manganês superóxido dismutase
SOD3	superóxido dismutase extracelular
SP-1	fator de transcrição SP-1
Taq	DNA polimerase purificada da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris EDTA
TG	triglicerídeos
TGF- $\beta$	fator de crescimento transformante beta
UDP-GlcNAc	UDP-N-acetilglucosamina
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
WESDR	<i>Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy</i>
ECA	enzima conversora da angiotensina

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
<	menor que
=	igual a
>	maior que
K <sub>m</sub>	constante de Michaelis
l	litro
m	metro
m	mili
M	molar
mg	miligramas
mL	mililitro
mmHg	milímetros de mercúrio
Mn	manganês
Nκβ	fator nuclear κB
ng	nanograma
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	radical superóxido
°C	graus Celsius
OH <sup>-</sup>	radical hidroxil
<i>p</i>	significância estatística
pMol	picomol
U	unidade
V	volts

*Zn*

zinco

$\chi^2$

qui-quadrado

Cu

cobre



## LISTA DE FÓRMULAS

KCl                    cloreto de potássio

H<sub>2</sub>O                    água

NO                    óxido nítrico

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do mecanismo unificador das vias de dano celular induzido pela hiperglicemia.. .....	13
Figura 2. Representação esquemática do sistema glutaciona .....	17
Figura 3. Seqüência da região promotora do gene <i>GPX3</i> redefinida por Bierl <i>et al</i> ..	32
Figura 4. Gel de agarose representativo dos três genótipos do polimorfismo -129 C/T na região promotora do gene <i>GCLC</i> . .....	46
Figura 5. Representação do resultado da genotipagem do gene <i>GPX1</i> com os três possíveis tamanhos de fragmentos amplificados. ....	47
Figura 6. Eletroferogramas representativos de cada um dos três possíveis genótipos referentes ao polimorfismo localizado na posição - 65 da região promotora do gene que codifica a enzima GPX-3 .....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos resultados de estudos de associação entre genes candidatos e nefropatia em pacientes com diabetes melito tipo 1 .....	24
Tabela 2 - Resumo dos resultados de estudos de associação entre genes candidatos e retinopatia em pacientes com diabetes melito tipo 1 .....	25
Tabela 3 - Classificação da nefropatia conforme valores de excreção urinária de albumina.....	39
Tabela 4 - Definição da doença renal crônica conforme os critérios do <i>National Kidney Foundation</i> .....	40
Tabela 5 - Estágios da doença renal crônica conforme os critérios do <i>National Kidney Foundation</i> .....	40
Tabela 6 - <i>Primers</i> utilizados nas reações em cadeia da polimerase e tamanho dos fragmentos de DNA amplificados.....	44
Tabela 7 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo 1 de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética avançada.....	55
Tabela 8 - Regressão logística binária para nefropatia diabética avançada.....	56
Tabela 9 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo 1 de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética .....	58
Tabela 10 - Regressão logística binária para nefropatia diabética incipiente a avançada.....	59

Tabela 11 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo1 de acordo com o estágio da doença renal crônica.....	61
Tabela 12 - Análise de regressão logística binária para doença renal crônica estágios 3 a 5 .....	62
Tabela 13 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo 1 de acordo com a presença ou ausência de retinopatia diabética proliferativa.....	64
Tabela 14 - Regressão logística binária para retinopatia diabética proliferativa .....	65
Tabela 15 - Frequência dos genótipos do polimorfismo -129 C/T do gene <i>GCLC</i> em pacientes diabéticos tipo 1 e em indivíduos controle não diabéticos.....	67
Tabela 16 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo1 de acordo com os genótipos do polimorfismo -129C/T no gene <i>GCLC</i> .....	68
Tabela 17 - Frequência dos genótipos CT + TT do polimorfismo -129C/T do gene <i>GCLC</i> de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética avançada .....	70
Tabela 18 - Regressão logística binária para nefropatia diabética avançada.....	70
Tabela 19 - Frequência dos genótipos CT + TT do polimorfismo -129C/T do gene <i>GCLC</i> de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética incipiente a avançada .....	72
Tabela 20 - Regressão logística binária para nefropatia diabética incipiente a avançada.....	72
Tabela 21 - Frequência dos genótipos CT + TT do polimorfismo -129C/T do gene <i>GCLC</i> de acordo com o estágio da doença renal crônica.....	74

Tabela 22 - Análise de regressão logística binária para doença renal crônica estágios 3 a 5 .....	74
Tabela 23 - Frequência do genótipos CT + TT do polimorfismo -129C/T do gene <i>GCLC</i> de acordo com a presença ou ausência de retinopatia diabética proliferativa (RDP).....	75
Tabela 24 - Frequência dos alelos e genótipos do polimorfismo com repetições GCG no gene <i>GPXI</i> em diabéticos tipo 1 e em controles não diabéticos.....	76
Tabela 25 - Frequência dos genótipos com quatro, cinco e seis repetições do polimorfismo GCG no gene <i>GPXI</i> de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética avançada.....	78
Tabela 26 - Frequência dos genótipos com quatro, cinco e seis repetições do polimorfismo GCG no gene <i>GPXI</i> de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética .....	78
Tabela 27 - Frequência dos genótipos com quatro, cinco e seis repetições do polimorfismo GCG no gene <i>GPXI</i> de acordo com o estágio da doença renal crônica .....	79
Tabela 28 - Frequência dos genótipos com quatro, cinco e seis repetições do polimorfismo GCG no gene <i>GPXI</i> de acordo com a presença ou ausência de retinopatia diabética proliferativa .....	79
Tabela 29 - Frequência dos genótipos do polimorfismo -65T/C no gene <i>GPX3</i> em pacientes diabéticos tipo 1 e em indivíduos-controle não diabéticos.....	81
Tabela 30 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo 1 de acordo com os genótipos do polimorfismo -65T/C no gene <i>GPX3</i> .....	82

Tabela 31 - Frequência dos genótipos TC + CC do polimorfismo -65T/C no gene <i>GPX3</i> de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND) avançada.....	84
Tabela 32 - Regressão logística binária para nefropatia diabética avançada.....	84
Tabela 33 - Frequência dos genótipos TC + CC do polimorfismo -65T/C no gene <i>GPX3</i> de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética ....	85
Tabela 34 - Frequência dos genótipos TC + CC do polimorfismo -65T/C do gene <i>GPX3</i> de acordo com o estágio da doença renal crônica .	86
Tabela 35 - Frequência dos genótipos TC + CC do polimorfismo -65T/C no gene <i>GPX3</i> de acordo com a presença ou ausência de retinopatia diabética proliferativa .....	87
Tabela 36 - Frequência dos haplótipos formados pelos alelos dos genes <i>GCLC</i> e <i>GPX3</i> de acordo com presença das complicações diabéticas .....	89

## Resumo

Vieira, SM. Estudo da associação entre polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo da glutatona e a suscetibilidade a complicações microvasculares no diabetes melito tipo 1 [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 114 p.

**INTRODUÇÃO:** acredita-se que o controle glicêmico inadequado, a duração do diabetes melito (DM) e a presença de hipertensão arterial e dislipidemia sejam os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento das complicações microvasculares no DM, contudo, existem inúmeras evidências sugerindo que uma predisposição genética participe da suscetibilidade para o desenvolvimento dessas complicações. Vários genes relacionados aos mecanismos dos danos induzidos pela hiperglicemia têm sido investigados. O papel do estresse oxidativo na patogênese das complicações crônicas do DM vem sendo demonstrado e os genes que codificam enzimas que participam dos mecanismos antioxidantes são candidatos a conferirem suscetibilidade ou proteção contra as complicações crônicas. A glutatona é um dos mais importantes antioxidantes endógenos; no entanto, a associação entre polimorfismos em genes que codificam enzimas que participam desse sistema e complicações crônicas do DM foi pouco explorada na literatura. **OBJETIVOS:** avaliar a associação de polimorfismos em três genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo da glutatona com o desenvolvimento de nefropatia e retinopatia em pacientes diabéticos tipo 1. Foram estudados: o polimorfismo -129C/T do gene *GCLC*, o número de repetições do trinucleotídeo GCG no exon 1 do gene *GPX1* e o polimorfismo -65T/C do gene *GPX3*. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** 299 pacientes (139 do gênero masculino e 160 do gênero feminino) com DM tipo 1 com mais de 15 anos de diagnóstico e mau controle glicêmico foram divididos conforme presença ou ausência das seguintes complicações: nefropatia diabética (ND) avançada, ND, doença renal crônica (DRC) estágios 3 a 5 e retinopatia diabética proliferativa (RDP). Em cada grupo foram avaliadas as frequências das variantes alélicas dos três genes estudados. **RESULTADOS:** a distribuição dos genótipos na população estudada foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg para os três genes analisados. A presença de pelo menos um alelo T do polimorfismo -129C/T do gene *GCLC* conferiu risco independente para a presença de ND avançada ( $OR = 2,82$ ;  $IC\ 95\% = 1,13 - 7,05$ ;  $p = 0,026$ ), para ND ( $OR = 3,64$ ;  $IC\ 95\% = 1,27 - 10,36$ ;  $p = 0,016$ ) e para DRC estágios 3 a 5 ( $OR = 5,74$ ;  $IC\ 95\% = 2,17 - 15,1$ ;  $p < 0,001$ ) e a presença de pelo menos um alelo C do polimorfismo -65 T/C conferiu risco independente para a presença de ND avançada ( $OR = 2,62$ ;  $IC\ 95\% = 1,19 - 5,72$ ,  $p = 0,022$ ) na população estudada. Não houve associação do número de repetições do trinucleotídeo GCG do gene *GPX1* com nenhuma das complicações estudadas. O haplótipo CC\_TT, composto pelos alelos selvagens dos genes *GCLC* e *GPX3*, foi negativamente associado com ND avançada ( $OR = 0,32$ ,  $IC\ 95\% = 0,15 - 0,66$ ;  $p = 0,002$ ) e DRC ( $OR = 0,25$ ;  $IC\ 95\% = 0,11 - 0,55$ ;  $p = 0,001$ ). **CONCLUSÕES:** a presença de pelo menos um alelo T do polimorfismo -129 C/T do gene *GCLC* e de pelo menos um alelo C do polimorfismo -65 T/C do gene *GPX3*, ambos associados a uma menor atividade transcricional do respectivo gene, conferiram risco para a presença de complicações renais na população de pacientes estudada.

**Descritores:** diabetes melito tipo 1, complicações crônicas, estresse oxidativo, polimorfismos, glutatona, gama glutamil cisteína sintetase, glutatona peroxidase

## Summary

Vieira, SM. Association between polymorphisms in genes related to glutathione metabolism and susceptibility to microvascular complications in type 1 diabetes mellitus [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 114 p.

**INTRODUCTION:** glycemic control, diabetes duration, systemic hypertension and dyslipidemia have been implicated as main risk factors for the development of diabetic microangiopathy, however there is evidence suggesting that genetic predisposition plays a role in the susceptibility to microvascular complications. Based on underlying pathogenesis, polymorphisms of several genes belonging to multiple pathways have been investigated, like the genes related to mechanisms of hyperglycemia-induced damage. The role of oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complication has been increasingly demonstrated and genes coding enzymes involved in antioxidant defense are candidates to confer susceptibility or protection against these complications. Glutathione is one the most important endogen antioxidants, however, the association between polymorphisms in genes related to glutathione metabolism and diabetic complications has not been deeply investigated. **OBJECTIVES:** to study the association between polymorphisms in three genes which code enzymes related to glutathione metabolism and the development of nephropathy and retinopathy in type 1 diabetic patients: the polymorphism -129 C/T of *GCLC*, the number of trinucleotide GCG repeats at exon 1 of *GPX1* and the polymorphism -65 T/C of *GPX3*. **CASUISTIC AND METHODS:** 299 type 1 diabetic patients (139 male and 160 female) with at least 15 years from diagnosis and poor glycemic control were studied. The patients were divided in two groups according to the presence or absence of diabetic complications: with and without diabetic nephropathy (DN), advanced DN, chronic kidney disease (CKD) stages 3 to 5 and proliferative diabetic retinopathy (PDR). **RESULTS:** The allelic distribution of the three studied polymorphisms was consistent with Hardy-Weinberg equilibrium. The presence of at least one T allele of *GCLC* -129 C/T was an independent risk factor for advanced DN ( $OR = 2.82$ ;  $CI\ 95\% = 1.13 - 7.05$ ;  $p = 0.026$ ), for DN ( $OR = 3.64$ ;  $CI\ 95\% = 1.27 - 10.36$ ;  $p = 0.016$ ) and for CKD stages 3 to 5 ( $OR = 5.74$ ;  $CI\ 95\% = 2.17 - 15.1$ ;  $p < 0.001$ ) and the presence of at least one C allele of *GPX3* -65 T/C was an independent risk factor for advanced DN ( $OR = 2.62$ ;  $IC\ 95\% = 1.19 - 5.72$ ,  $p = 0.022$ ) in the studied population. There were no associations between GCG trinucleotide repeats of *GPX1* and diabetic complications. The haplotype CC\_TT, composed by *GCLC* and *GPX3* wild type alleles, was negatively related to advanced DN ( $OR = 0.32$ ,  $CI\ 95\% = 0.15 - 0.66$ ;  $p = 0.002$ ) and CKD ( $OR = 0.25$ ;  $CI\ 95\% = 0.11 - 0.55$ ;  $p = 0.001$ ). **CONCLUSIONS:** the presence of at least one T allele of -129C/T polymorphism of *GCLC* and one C allele of -65 T/C polymorphism of *GPX3*, both associated to a lower transcriptional activity of its genes, conferred risk for renal complications in the studied population.

**Keywords:** type 1 diabetes, diabetic complication, oxidative stress, polymorphisms, glutathione, gamma-glutamyl cystein syntase, glutathione peroxidase



# **1 INTRODUÇÃO**

## ***1.1 Epidemiologia do diabete melito***

### ***1.1.1 No mundo***

O diabete melito (DM) é uma síndrome caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina associados ou não à resistência a ação desse hormônio. Estima-se que 9% da população mundial sejam pacientes com DM, em torno de 177 milhões de pessoas, segundo levantamento feito no ano 2000 pela Organização Mundial de Saúde (1).

Com base em uma população mundial de 1,8 bilhões de crianças de 0 a 14 anos, estima-se que 0,02% delas sejam diabéticas, e a incidência anual de novos casos nesse grupo chega a 65.000 (2).

### ***1.1.2 No Brasil***

De acordo com os dados oficiais brasileiros do censo de 1988, 7,8% da população brasileira é portadora de DM. Esses dados possivelmente são subestimados, visto que, nesse mesmo censo, 46,5% dos pacientes com DM entre 30 e 69 anos desconheciam serem portadores da doença (3). Segundo os dados da OMS, existem cerca de 4.557.000 pacientes com DM no Brasil, com projeção de crescimento para 11.305.000 indivíduos até 2030 (1). Em relação ao DM tipo 1, a *International Diabetes Federation* (IDF) estima sua incidência na população de zero a 14 anos de oito casos por 100.000 habitantes (2).

O DM está relacionado ao desenvolvimento de aterosclerose acelerada que origina as complicações macrovasculares como o infarto do miocárdio, o acidente vascular cerebral e a insuficiência vascular periférica, bem como às complicações microvasculares que determinam a retinopatia, nefropatia e neuropatia nos pacientes com DM tipo 1 e 2 (4, 5).

Devido à microangiopatia, o DM é uma das principais causas de cegueira, insuficiência renal crônica e neuropatias debilitantes. Juntamente com a hipertensão arterial, constituem os principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares (1).

### ***1.2 Epidemiologia e fatores de risco para desenvolvimento das complicações diabéticas***

A epidemiologia das complicações diabéticas varia bastante com a população estudada. É bem conhecido que o controle glicêmico intensivo do DM diminuiu a incidência de complicações microvasculares em pacientes com DM tipo 1, porém, associou-se ao aumento do número de hipoglicemias (4). No Brasil, não existem, até o momento, dados de prevalência das complicações diabéticas em pacientes com DM tipo 1.

Ainda que o papel da hiperglicemia crônica, modulado por fatores como idade de início e duração do DM, e dos demais fatores de risco estejam bem estabelecidos, o aparecimento das complicações crônicas em um indivíduo é determinado por sua suscetibilidade genética à lesão induzida pelas anormalidades metabólicas desencadeadas pela hiperglicemia crônica. A importância da predisposição genética é ilustrada por dados recém-publicados em uma coorte de

6.707 famílias com DM1 que demonstrou que a presença de complicação em um irmão aumenta o risco para aquela complicação no paciente, com uma razão de risco de 9,9 para a retinopatia, 6,2 para a nefropatia e 2,2 para a neuropatia. Além disso, o risco para nefropatia aumenta significativamente em pacientes que têm um dos pais com DM2 (6).

### ***1.2.1 Nefropatia diabética e doença renal crônica***

O DM é a principal causa de doença renal crônica (DRC) em países desenvolvidos e rapidamente está se tornando líder em países em desenvolvimento, como consequência do aumento da obesidade (7). Segundo dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia, a hipertensão arterial e o DM são responsáveis por cerca de metade dos pacientes que estão em tratamento dialítico. Esses números são comparáveis aos de outros países da América Latina, mas são menores do que nos Estados Unidos da América (EUA), onde as duas doenças são a causa de DRC em 75% dos pacientes em diálise. Essas discrepâncias podem ser parcialmente explicadas pelo grande número de pacientes idosos, característica dos países desenvolvidos (8).

A principal característica da nefropatia diabética (ND) é a presença de excreção de albumina urinária (EAU) anormal. A incidência cumulativa de microalbuminúria em pacientes com DM tipo 1 foi de 12,6% em 7,3 anos, de acordo com o estudo *European Diabetes Prospective Complications Study Group* (EURODIAB) (9); e a proteinúria ocorre em 15 a 40% dos pacientes com DM, com pico de incidência por volta dos 15 a 20 anos de doença (10-12). Nos EUA, a

microalbuminúria é encontrada em 43% e a macroalbuminúria em 8% daqueles com diagnóstico de DM (7) e a nefropatia é mais prevalente em americanos afro-descendentes, asiáticos e americanos nativos que em caucasianos (13).

O controle glicêmico parece ser o fator de risco dominante para ocorrência de microalbuminúria no DM, embora a progressão para estágios mais avançados sofra influência da hipertensão (14), hipercolesterolemia, fatores genéticos (15) e tabagismo (16). No estudo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT), a terapia intensiva reduziu o risco de desenvolvimento de microalbuminúria em 34% (4). Em relação ao efeito da terapia intensiva na prevenção secundária, houve redução da progressão para proteinúria clínica em 56% (17). O efeito benéfico do controle glicêmico intensivo em reduzir complicações foi mantido por sete a oito anos após o término do estudo DCCT, nos pacientes submetidos ao controle intensivo prévio (14).

A história natural da ND demonstra a importância da suscetibilidade genética em seu desenvolvimento, pois se a hiperglicemia fosse o único fator de risco, a prevalência da ND aumentaria ao longo do tempo até que a maioria dos pacientes diabéticos desenvolvesse essa complicação (18). Além disso, já se demonstrou uma agregação familiar importante para o desenvolvimento da ND (19, 20). Quando ambos os pais têm ND, a doença é observada em 46% dos descendentes, em comparação com apenas 23% de descendentes que progrediram para ND se apenas um dos pais era proteinúrico e 14% se ambos os pais não tinham ND (21). Seaquist e colaboradores (22) demonstraram que 83% dos pacientes com DM tipo 1 pertencentes a famílias caucasianas com ND tinham proteinúria maciça, enquanto apenas 17% dos pacientes com DM tipo 1 de famílias sem nefropatia

desenvolveram ND, a despeito do controle glicêmico. Quinn e colaboradores (23) demonstraram que a presença de nefropatia em diabéticos é fortemente influenciada pelo grau de proteinúria em seus irmãos diabéticos. Setenta e dois por cento do risco cumulativo de ND foi observado em pacientes cujos irmãos diabéticos tinham proteinúria, comparado a 25% de risco cumulativo naqueles com irmãos com normoalbuminúria.

### ***1.2.2 Retinopatia diabética***

A retinopatia diabética (RD) é a principal causa de perda visual e cegueira (1) e está associada à diminuição de sobrevida, o que geralmente é atribuído à doença cardiovascular (24-26). A RD é clinicamente dividida em dois estágios principais: retinopatia diabética não proliferativa (RDNP), também chamada de retinopatia de fundo ou *background*, e a retinopatia proliferativa (RDP), cuja característica principal é a formação de neovasos retinianos.

A duração (25) e a idade de início do DM são fatores relevantes para o desenvolvimento da RD, e parece haver um risco aumentado de desenvolvimento das microangiopatias de forma geral em pacientes com DM de início na puberdade em relação aos pacientes cujo DM se iniciou antes da puberdade, talvez pelas alterações hormonais associadas a esse período da vida (27).

O estudo *Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study II*, publicado em 1990, encontrou retinopatia *background* presente em quase todos os pacientes após 20 anos de DM, enquanto a retinopatia proliferativa afetou 70% dos pacientes com DM tipo 1 após 30 anos de diagnóstico (25). Estudos mais recentes

têm mostrado uma diminuição na incidência de RDP, mas faltam dados de grandes populações que demonstrem alterações na incidência de RD em seus estágios iniciais (28). Essa redução na frequência da RD nas últimas décadas reflete a melhora do controle glicêmico dos pacientes, já que se sabe desde os resultados do DCCT que o controle intensivo reduz em 76% o risco de desenvolvimento de RD e, em pacientes com retinopatia leve a moderada, o tratamento intensivo diminui a progressão para RDP ou RNP grave (4).

Os estudos de prevalência de RD no Brasil foram realizados em populações pequenas em serviços de saúde referenciados. Santos e colaboradores avaliaram a prevalência de RD em 21 diabéticos tipo 2, e a prevalência encontrada nestes pacientes foi de 47% (29). Em pacientes com DM tipo 1, a prevalência em um estudo na população pediátrica de São Paulo foi de 17,3% em 81 indivíduos (30).

Vários estudos demonstraram a influência da HAS no risco para aparecimento de RD, desenvolvimento de formas clínicas mais graves e progressão mais rápida da RD. A gravidez também é reconhecida como um fator de risco, já que com ela a RD pode evoluir rapidamente; no entanto, a progressão é geralmente transitória e o risco da progressão no longo prazo não parece ser aumentado pela gravidez. Os fatores de risco para a progressão da RD durante a gestação são a sua gravidade antes da concepção, um controle glicêmico inadequado e a presença concomitante de HAS (31).

O tabagismo (32) e a dislipidemia (32, 33) também já foram implicados no desenvolvimento da retinopatia; no entanto, as evidências são menos conclusivas que para a participação desses fatores de risco na nefropatia diabética. Existem estudos, ainda, que sugerem que a anemia possa aumentar o risco de progressão

para formas mais graves de RD. Por outro lado, o uso de aspirina em diabéticos não está associado a um risco aumentado de hemorragia ou progressão da RD ou do edema de mácula. A inter-relação entre RD e ND é complexa e a freqüente co-existência das duas complicações pode refletir fatores predisponentes em comum. De qualquer forma, a presença e a gravidade da RD são indicadores de risco para proteinúria importante, assim como a proteinúria prediz RD proliferativa (32).

Os estudos clínicos em diabéticos evidenciam variações significativas no início e na gravidade da RD que não são explicadas por fatores de risco conhecidos, como duração da doença e grau de controle glicêmico (34, 35), sugerindo que a predisposição genética também influencie no aparecimento e na evolução desta microangiopatia. Outros achados que falam a favor da participação genética são: risco aumentado para desenvolvimento de RD grave em irmãos de pacientes afetados (36), a agregação familiar (35) e as diferenças na freqüência desta complicação entre diferentes populações (37).

### ***1.3 Principais mecanismos implicado na patogênese das complicações crônicas***

Vários mecanismos são propostos para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia (glicotoxicidade). Os principais são: aumento da ativação da via dos polióis, aumento da formação dos produtos finais de glicação avançada (*Advanced glycated endproducts*, AGEs), aumento da ativação da proteína quinase C e da via da hexosamina.



### ***1.3.1 Aumento da ativação da via dos polióis***

O aumento da glicose intracelular naqueles tecidos nos quais a captação de glicose não depende de insulina, incluindo retina, rins, nervos periféricos, resulta em sua conversão a sorbitol pela aldose redutase. Essa enzima apresenta uma baixa afinidade (alto Km) para a glicose e, em situações de normoglicemia, a metabolização da glicose por essa via corresponde a uma porcentagem muito pequena do uso global da glicose. Em condições de hiperglicemia, entretanto, o aumento da glicose intracelular resulta em sua conversão enzimática para sorbitol que, por sua vez, é oxidado à frutose pela enzima sorbitol desidrogenase. O sorbitol não se difunde facilmente através das membranas e isso pode resultar no aumento do dano osmótico às células, o que era considerado o principal mecanismo envolvido nos efeitos deletérios do sorbitol. A redução da glicose a sorbitol consome nicotinamida adenina difosfato (NADPH), necessária para regeneração da glutathiona reduzida (GSH) pela enzima glutathiona redutase. Em consequência da diminuição das concentrações intracelulares de glutathiona, pode haver exacerbação do estresse oxidativo intracelular, mecanismo atualmente considerado o mais importante para explicar os efeitos deletérios associados à ativação da via dos polióis (38). O uso de inibidores da aldose redutase *in vivo* foi capaz de diminuir a incidência de polineuropatia periférica diabética (39).

### ***1.3.2 Aumento da formação dos AGEs***

A glicose possui um grupo aldeído capaz de reagir não enzimaticamente com o grupo amino das proteínas, levando à formação dos produtos de Amadori, dos quais o mais conhecido é a hemoglobina glicada. Outras reações ocorrem a partir desse ponto para produzir um grupo de compostos denominados AGEs, que se ligam irreversivelmente às proteínas. Essas modificações químicas de proteínas teciduais, lipídios e DNA afetam as suas estruturas, funções e *turnover*, contribuindo para a patogênese das complicações diabéticas de inúmeras formas, por exemplo, promovendo alteração da composição da matriz extracelular nos vasos e nos glomérulos e da expressão de fatores de crescimento por macrófagos, células endoteliais vasculares e pelas células mesangiais renais. Dentre as várias proteínas celulares capazes de se ligar aos AGEs e mediar seus efeitos deletérios, está o receptor de AGEs (RAGEs).

Uma das principais vias de detoxificação dos AGEs é o sistema da enzima glioxalase, que necessita de glutathiona.

### ***1.3.3 Aumento da ativação da proteína quinase C***

A família da proteína quinase C (PKC) compreende várias isoformas, algumas ativadas pelo segundo mensageiro diacilglicerol (DAG). A ativação da PKC resulta em diminuição da produção de óxido nítrico (NO), aumento da atividade da endotelina-1, alteração na expressão de fatores de crescimento tais como, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator transformador de

crescimento beta (TGF- $\beta$ ), além da ativação do fator de transcrição NF $\kappa$  $\beta$  e da enzima NADPH oxidase.

#### ***1.3.4 Aumento da ativação da via da hexosamina***

A glicose intracelular em excesso é desviada para a via da hexosamina, onde é convertida à frutose-6-fosfato, que por sua vez é transformada a N-acetilglicosamina-6-fosfato pela enzima Glutamina: frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT). A N-acetilglicosamina 6-fosfato é posteriormente convertida a UDP-N-acetilglicosamina que, por mecanismos não totalmente esclarecidos, modula a expressão de proteínas que funcionam como fatores de transcrição e que acabam por alterar a expressão de várias proteínas, tais como o inibidor do ativador do plasminogênio-tipo 1 (PAI-1) e o fator de crescimento TGF- $\beta$ , envolvidos na vasculopatia diabética.

#### ***1.3.5 Estresse oxidativo***

Durante o metabolismo normal, o oxigênio é reduzido a água e, nesse processo, os produtos intermediários são o radical superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ), que conjuntamente são denominados espécies reativas de oxigênio (ROS: do inglês *reactive oxygen species*). Esses compostos têm meia vida ultracurta, pois a presença de um elétron não-pareado os torna extremamente reativos e capazes de causar danos a moléculas de DNA,

proteínas e lipídios. O estresse oxidativo se estabelece quando as defesas intracelulares antioxidantes são insuficientes para detoxificar os ROS ou, também, quando há produção excessiva de ROS.

Recentemente, o estresse oxidativo foi proposto como o elemento unificador de todas as vias de dano celulares anteriormente citadas e envolvidas na instalação das complicações diabéticas. Em condições de hiperglicemia, há um aumento da produção de ROS pelas mitocôndrias. Esses radicais livres bloqueiam a enzima GAPDH, enzima que participa da via glicolítica. Conseqüentemente, há aumento de todos os substratos (anteriores ao bloqueio) e com isso ativação das vias anteriormente descritas (Figura 1, modificada de Brownlee, 2001) (40).



#### ***1.4 Principais mecanismos antioxidantes protetores***

Os sistemas enzimáticos e não-enzimáticos de defesa celular contra o estresse oxidativo envolvem vários compostos, entre eles as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e o sistema glutaciona, que engloba a glutaciona, as enzimas gama-glutamilcisteína sintetase (GCL), glutaciona sintetase, glutaciona peroxidases (GPX), glutaciona S-transferases e glutaciona redutase (GR). Há também macromoléculas como albumina e ceruloplasmina e moléculas pequenas como vitamina C e E, beta-caroteno e ácido úrico que participam desse processo (41, 42).

##### ***1.4.1 Superóxido dismutases e catalase***

As enzimas SOD pertencem à família da metaloenzimas e convertem o radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Há três principais formas de superóxido dismutases (SOD): cobre-zinco-SOD (SOD1), presente no espaço intracelular, a manganês-SOD (SOD2), presente na mitocôndria e a SOD extracelular (SOD3). Essas enzimas são as mais extensivamente estudadas no processo de estresse oxidativo. A catalase está presente no citosol e nos peroxisomos, e converte o peróxido de hidrogênio em água (41).

##### ***1.4.2 Sistema glutaciona***

A glutaciona é um tripeptídeo composto pelos aminoácidos glutamina, cisteína e glicina e representa um dos principais compostos antioxidantes. A síntese

da glutathiona requer a ação consecutiva de duas enzimas, a primeira (etapa limitante) é a gama-glutamil cisteína sintetase ( $\gamma$ -GCL) e a seguir a glutathiona sintetase. A glutathiona detoxifica uma série de compostos através das enzimas glutathionas S-transferases e das glutathionas peroxidases. Múltiplas formas de isoenzimas glutathionas S-transferase (GST) estão presentes nos tecidos humanos como dímeros pertencentes a três famílias distintas de genes denominadas alfa, mu e pi. Essas subunidades são expressas de forma tecido-específica, sendo que a composição de glutathiona-S-transferases varia de tecido para tecido (43).

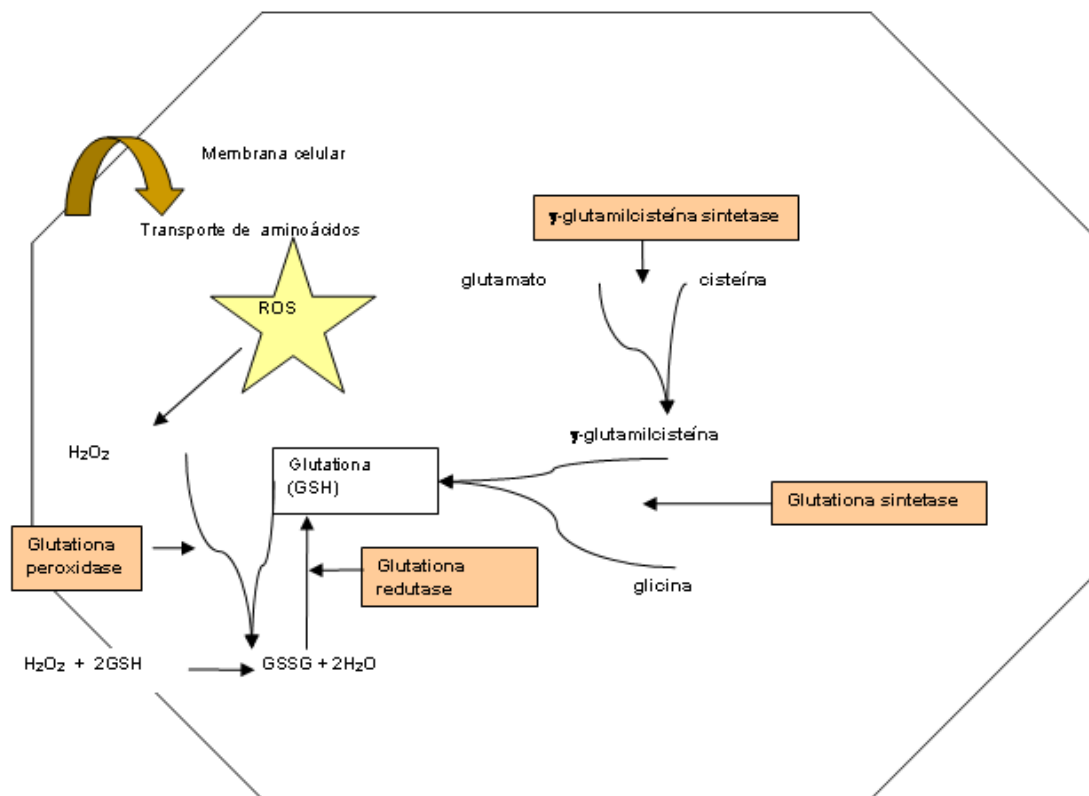
As glutathionas peroxidases são enzimas da família das selenoproteínas que catalisam a inativação do oxigênio reativo e espécies de nitrogênio, utilizando a glutathiona para formar a glutathiona oxidada, que deve ser novamente reduzida pela enzima glutathiona redutase, que utiliza como co-fator o NADPH do ciclo das pentoses (42).

A glutathiona reduzida é uma das principais substâncias antioxidantes intracelulares. A hiperglicemia crônica leva ao aumento da ativação da via dos polióis com o maior consumo de NADPH, diminuindo sua disponibilidade para a redução da glutathiona pela glutathiona redutase (38).

Até o momento, cinco tipos de glutathionas peroxidases (GPX) foram descritas em humanos: GPX-1 (clássica), GPX-2 (gastrointestinal), GPX-3 (plasmática), GPX-4 (fosfolípido hidroperoxidase) e GPX 5 (epididimal). A GPX-1 ou clássica é expressa em vários tecidos, principalmente em eritrócitos, rins e fígado. A GPX-2 é expressa primariamente no tubo gastrointestinal e protege contra a toxicidade de lipídios peroxidados ingeridos. A GPX-3 está presente principalmente no plasma, mas também é expressa em rins, coração, pulmões e placenta. A GPX-4 é expressa

principalmente no epitélio do sistema reprodutor, rins e olhos enquanto a GPX-5 é expressa no epidídimo (44).





**Figura 2. Representação esquemática do sistema glutatona**

GSH – glutatona reduzida; GSSG – glutatona oxidada; ROS – espécies reativas de oxigênio; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio; H<sub>2</sub>O – água.

### ***1.5 Estresse oxidativo e diabetes melito***

As concentrações de todos os marcadores do estresse oxidativo estão modificados em pacientes com DM (45), tanto do tipo 1 (46) quanto do tipo 2 (47). Em pacientes com DM tipo 2, há evidência de peroxidação dos lipídios dada pela alta concentração plasmática (48) e urinária (49-51) de isoprostanos. A formação de nitrotirosinas é aumentada em pacientes com ambos os tipos de DM. (52, 53).

Um estudo realizado por Pereira e colaboradores demonstrou que o aumento de marcadores de estresse oxidativo já ocorre em indivíduos com tolerância diminuída à glicose quando comparados a indivíduos não diabéticos. Nesse estudo, as concentrações de antioxidantes séricos, entre eles a glutathiona reduzida, foram progressivamente menores nos pacientes com tolerância diminuída à glicose e nos pacientes com DM tipo 2 em comparação a indivíduos não diabéticos (54).

Estudos em pacientes com DM e complicações microvasculares demonstraram alterações na expressão de enzimas antioxidantes. Hodgkinson e colaboradores compararam a expressão de várias enzimas antioxidantes no sangue periférico de pacientes diabéticos com nefropatia, sem nefropatia e indivíduos controle em condições de normoglicemia e hiperglicemia. Houve uma maior expressão de três das quatro enzimas estudadas nos indivíduos normais e nos pacientes com DM sem nefropatia e uma diminuição da expressão destas enzimas nos pacientes com nefropatia (55). Ceriello e colaboradores avaliaram a resposta dessas enzimas, desta vez em fibroblastos, e observaram que a expressão das enzimas SOD1, SOD2, catalase e GPX eram significativamente maiores em

pacientes com DM sem nefropatia e controles normais em comparação aos pacientes diabéticos com nefropatia (56).

Recentemente, Hernández-Marco e colaboradores demonstraram aumento de marcadores séricos de estresse oxidativo em diabéticos tipo 1 jovens com hiperfiltração glomerular (ritmo de filtração glomerular [RFG]  $\geq 150$  mL/min/1,73m<sup>2</sup>). Os autores sugerem que o aumento do estresse oxidativo possa estar implicado no desenvolvimento da ND mesmo em fases iniciais e sugerem para sua prevenção, além do controle intensivo da glicemia, uma dieta rica em antioxidantes (57).

O aumento do estresse oxidativo também foi implicado no desenvolvimento da RD. Dong e colaboradores demonstraram aumento de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) urinária, marcador de estresse oxidativo, em diabéticos tipo 2 em relação a indivíduos não diabéticos. Os pacientes com RDP apresentavam concentrações maiores de 8-OHdG urinária em relação aos pacientes com RDNP ou sem retinopatia (58).

Ali e colaboradores demonstraram aumento do estresse oxidativo em retinas humanas, indicado pelo aumento de 1,6 vezes na peroxidação lipídica nesse tecido. Segundo os autores, o aumento do estresse oxidativo resulta em inibição das vias de sinalização do fator de crescimento neural (59).

### ***1.6 Genes candidatos para a microangiopatia diabética***

Duas principais estratégias são usadas para explorar o genoma humano e buscar evidências de alterações genéticas que contribuam para o desenvolvimento de doenças monogênicas (causadas por mutações em um único gene) e poligênicas (causadas por polimorfismos em inúmeros genes e por fatores ambientais).

O desenvolvimento de mapas do genoma permitiu a identificação de genes relacionados a doenças mesmo que não se tenha um conhecimento avançado sobre elas. Essa estratégia, conhecida como rastreamento genômico (*genome scan*) identifica genes não com base em suas funções, mas sim em sua posição no genoma. Essa posição é determinada pelo estudo da co-segregação de uma doença com marcadores polimórficos distribuídos no DNA de várias famílias acometidas. Esses polimorfismos não têm significado funcional, mas estão em posições conhecidas em cada um dos cromossomas e por isso funcionam como marcadores. Se um determinado marcador estiver muito próximo do gene causador da doença que se está investigando, eles serão herdados juntos. Análises estatísticas complexas determinam a probabilidade dos diferentes marcadores estarem associados ao gene causador da doença e permitem que se conheça a região que alberga o gene. Como essas regiões em geral são de grande extensão, é necessário que se avalie que gene nelas presente pode ser relevante na doença em questão e o mesmo deve ser seqüenciado nos pacientes acometidos para rastreamento de mutações.

A segunda estratégia, mais simples que o rastreamento genômico, é aquela que pressupõe algum conhecimento sobre a fisiopatologia da doença: a abordagem

do gene candidato, na qual se investigam genes envolvidos em vias biológicas específicas relacionadas ao que se conhece da fisiopatologia da doença que está sendo estudada.

Aproximadamente 0,1% da seqüência do genoma difere entre os seres humanos, e a maioria dessas diferenças corresponde a polimorfismos (ou seja, variações presentes em mais de 1% da população). A forma mais comum de polimorfismo é conhecida por SNP, na qual há troca, inserção ou deleção de um único nucleotídeo na molécula de DNA.

A predisposição a doenças poligênicas tais como a obesidade e DM e suas complicações, entre outras, é determinada por esses polimorfismos, e a investigação de polimorfismos que participam da suscetibilidade a essas doenças tem se mostrado muito mais difícil do que a identificação de genes causadores de doenças monogênicas, por inúmeras razões, tais como: 1) grande número de SNPs no genoma humano (aproximadamente 10 milhões); 2) múltiplos genes influenciando a expressão da doença, cada um deles com um efeito relativamente fraco; 3) interação entre os genes e 4) importante participação dos fatores ambientais modulando o efeito genético (60). Além disso, características étnicas e geográficas influenciam a freqüência dos SNPs, de forma que a associação de um polimorfismo com um traço fenotípico em uma determinada população pode não se reproduzir em outras populações (61).

A maioria dos polimorfismos não tem repercussão funcional e auxilia na identificação de genes da mesma forma que os marcadores polimórficos mencionados acima, ou seja, por proximidade física com o gene. Alguns polimorfismos; no entanto, são considerados funcionais por serem capazes de

influenciar a expressão gênica, aumentando ou diminuindo a quantidade final da proteína codificada por aquele gene (62).

Existem numerosos estudos avaliando polimorfismos em genes candidatos para a ND em pacientes com DM 1, alguns deles sumarizados na Tabela 1(63). O gene *ACE*, que codifica a enzima conversora da angiotensina (ECA), foi o mais estudado em várias populações, tanto pelas evidências de participação do sistema renina-angiotensina (SRA) na lesão renal induzida pela glicose quanto pelo fato de existir uma variante genética nesse gene que influencia diretamente as concentrações plasmáticas da ECA – o polimorfismo I/D (64). Esse polimorfismo envolve a presença (inserção, I) ou a ausência (deleção, D) de um fragmento de DNA de 286 pares de bases no intron 16 do gene. Os níveis de atividade da ECA em indivíduos homozigotos para o alelo D (DD) são aproximadamente duas vezes maiores que os encontrados nos homozigotos para o alelo I (II), sendo que os indivíduos heterozigotos ID apresentam atividade intermediária (65). Acredita-se que na região de 286 pares de bases exista uma seqüência que regule negativamente a expressão do gene, de forma que o alelo D, por não possuir esse elemento regulador negativo, favoreça uma maior expressão gênica com conseqüente aumento das concentrações da ECA (66).

A associação do polimorfismo I/D com a predisposição para nefropatia foi demonstrada em uma coorte de 1.365 pacientes com DM tipo 1 (DCCT/EDIC *Genetics Study*), onde o genótipo II conferiu um menor risco para desenvolvimento de microalbuminúria persistente ( $OR = 0,62$ ;  $IC\ 95\% = 0,43-0,89$ ;  $p = 0,009$ ) e de nefropatia grave ( $OR = 0,56$ ;  $IC\ 95\% = 0,32-0,9$ ;  $p = 0,033$ ) (67).

O polimorfismo I/D também já foi avaliado em uma população de 30 DM tipo 1 normoalbuminúricos brasileiros seguidos prospectivamente por  $10,2 \pm 2,0$  anos, na qual se observou que a presença do alelo D foi o único fator preditivo para o declínio do RFG. Adicionalmente, um aumento significativo nos casos de hipertensão e retinopatia foi observado nos pacientes com genótipos I/D e DD, mas não nos pacientes com genótipo II (68).

O estudo GoKinD (*Genetics of Kidneys in Diabetes*) avaliou a associação de diversos genes com ND em 1.900 indivíduos com DM tipo 1 de longa data (mais de 10 anos de doença). O grupo controle consistia em indivíduos com normoalbuminúria após 15 anos de doença. Um dos resultados derivados do GoKinD demonstrou que os diabéticos homozigotos para o HLA-DRB1\*04 tinham uma redução de 50% na chance de desenvolver nefropatia em relação aos que não tinham este alelo (69).

A Tabela 2 (63) demonstra alguns genes candidatos já estudados quanto à associação com a RD. Apesar de vários genes já terem sido avaliados, poucos demonstraram uma forte associação com a frequência ou gravidade da retinopatia. A maioria dos estudos publicados foi baseada em um número pequeno de pacientes, e parece não haver a replicação de alguns achados em diferentes populações, o que é atribuído, entre outras coisas, a diferenças na forma de se classificar a retinopatia (70).

**Tabela 1 - Resumo dos resultados de estudos de associação entre genes candidatos e nefropatia em pacientes com diabetes melito tipo 1(63)**

Gene	Produto	Via	Etnia	Associação	N	Referência
<i>ACE</i>	Enzima conversora da angiotensina	Hemodinâmica	Caucasianos ND (brasileiros)	+ +	Metanálise 30	Kennon e cols., 1999. Azevedo e cols., 2002
<i>APOE</i>	Apolipoproteína E	Metabolismo de lipídeos	Caucasianos	+	419	Araki e cols., 2000
<i>AKR1B1</i>	Aldose redutase	Via dos polióis	Caucasianos	+	899	Lajer e cols., 2004
<i>CAT</i>	Catalase	Estresse oxidativo	Caucasianos	-	92	Chistyakov e cols., 2002
<i>CYP11B2</i>	Aldosterona sintetase	Hemodinâmica	Caucasianos	-	442	Lajer e cols., 2006
<i>ENPP1</i>	Pirfosfatase/Fosfo-diesterase Ectonucleotídeo	Proteína de membrana	Caucasianos ND (brasileiros)	+ -	659 30	Canani e cols., 2002. Azevedo e cols., 2002
<i>SLC2A1</i>	Transportador de glicose - GLUT1	Metabolismo da glicose	Caucasianos	-	199	Tarnow e cols., 2001
<i>PRKCB1</i>	Proteína kinase C	PKC	Caucasianos	+	451	Araki e cols., 2003
<i>NOS2A</i>	NO sintase induzível	Hemodinâmica	Caucasianos	-	464	Rippin e cols., 2003
<i>NOS3</i>	NO sintase endotelial	Hemodinâmica	Caucasianos	-	464	Rippin e cols., 2003
<i>SERPINE1</i>	Inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1)	Coagulação	Caucasianos	-	311	De Cosmo e cols., 1999
<i>AGER</i>	Receptor de produtos avançados de glicação	Via dos AGEs	Caucasianos Caucasianos Caucasianos	+ + +	867 487 996	Lindholm e cols., 2006. Prevost e cols., 2005. Petterson-Fernholm e cols., 2003
<i>CCL5</i>	Quimiocina RANTES	Inflamatória	Caucasianos	+	794	Wojciech e cols., 2005
<i>SOD1</i>	Cu-Zn superóxido desmutase	Estresse oxidativo	Caucasianos	+	1.362	Al-Kateb e cols., 2007
<i>UCP2</i>	Proteína desacopladora 2	Estresse oxidativo	Caucasianos	+	216	Lindholm e cols., 2004
<i>UCP3</i>	Proteína desacopladora 3	Estresse oxidativo	Caucasianos	+	216	Lindholm e cols., 2004
<i>TGFB1</i>	Fator de crescimento transformante $\beta$	Fator de crescimento	Caucasianos	+	830	Patel e cols., 2004
<i>GCLC</i>	Subunidade catalítica da enzima gama glutamil cisteína ligase	Estresse oxidativo	Miscigenada (brasileiros)	+	125	Vieira e cols., 2007



**Tabela 2 - Resumo dos resultados de estudos de associação entre genes candidatos e retinopatia em pacientes com diabetes melito tipo 1 (63)**

Gene	Produto	Via	Etnia	Associação	N	Referência
<i>ACE</i>	Enzima conversora da angiotensina	Hemodinâmica	Asiáticos	-	186	Nagi e cols., 1995
<i>APOE</i>	Apolipoproteína E	Metabolismo de lipídeos	Caucasianos	-	ND	Tarnow e cols., 2000
<i>AKR1B1</i>	Aldose redutase	Via dos polióis	Caucasianos	+	229	Demaine e cols., 2000
			Várias	-	50	Chistyakov e cols., 1997
			Caucasianos	-	ND	
			Miscigenada (Brasileiros)	+	64	Heesom e cols., 1997 Richeti e cols., 2007
<i>AGTR1</i>	Receptor A-II Tipo 1	Hemodinâmica	Caucasianos	-	222	Tarnow e cols., 2005
<i>CAT</i>	Catalase	Estresse oxidativo	Caucasianos	-	92	Chistyakov e cols., 2002
<i>EDN1</i>	Endotelina 1	Hemodinâmica	Caucasianos	-	156	Warpeha e cols., 1992
<i>SLC2A1</i>	Transportador de glicose GLUT-1	Metabolismo da glicose	Caucasianos	-	74	Hodgkinson e cols., 2001
<i>NOS2A</i>	NO sintase induzível	Hemodinâmica	Caucasiano	+	200	Warpeha e cols., 1992
<i>NOS3</i>	NO sintase endotelial	Hemodinâmica	Caucasianos	-	175	Warpeha e cols., 1992
<i>SERPINE1</i>	Inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1)	Coagulação	Caucasianos	-	ND	Tarnow e cols., 2000

## ***1.7 Polimorfismos em genes associados à defesa antioxidante***

### ***1.7.1 Superóxido dismutases***

Os polimorfismos nos genes que codificam essas enzimas foram estudados em DM e em outras doenças. Na população russa, foi demonstrada uma associação entre polimorfismos no gene da *SOD2* e *SOD3* e a presença de polineuropatia em pacientes com DM tipo 1 (71). Em japoneses, um polimorfismo no gene da *SOD2* foi associado à retinopatia e nefropatia em pacientes com DM tipo 2 (72).

### ***1.7.2 Catalase***

Polimorfismos no gene que codifica a catalase (*CAT*) foram estudados em pacientes finlandeses com DM tipo 2, não tendo se observado correlação com complicações macroangiopáticas (73). Chistiakov e colaboradores avaliaram a correlação de um polimorfismo no gene *CAT* com ND em pacientes russos com DM tipo 1, mas não observaram qualquer correlação (74).

### ***1.7.3 Sistema glutathiona***

O sistema glutathiona tem sido estudado em várias doenças, inclusive no DM. A diminuição das concentrações de glutathiona foi demonstrada em pacientes com

DM tipo 1 e complicações microvasculares, correlacionando-se diretamente com o controle glicêmico (75).

### **1.7.3.1 Glutathione S-transferases**

As glutathione S-transferases foram estudadas, em relação à suscetibilidade ao diabetes, por Yalin e colaboradores na população turca (76). Os autores avaliaram polimorfismos no gene da glutathione S-transferase-mu (*GSTM1*), glutathione S-transferase-teta (*GSTT1*) e glutathione S-transferase-pi (*GSTP1*). O alelo que contém uma deleção na posição 534 do gene que codifica a *GSTM1* (*GSTM1-0*) e que leva à perda da atividade dessa enzima foi associado ao aumento do risco de 3,7 vezes para desenvolvimento de DM.

O polimorfismo anterior (*GSTM1-0*) e outro polimorfismo que resulta na deleção no gene que codifica a enzima *GSTT* (*GSTT1-0*) foram estudados por Hossaini e colaboradores em relação a complicações em pacientes com DM tipo 2 na população árabe. A frequência do polimorfismo *GSTT1-0* foi maior no grupo com DM tipo 2 complicado que no grupo sem complicações (embora o intervalo de confiança do cálculo do *Odds ratio* tenha incluído o 1,0) (77).

Doney e colaboradores observaram aumento do risco de morbidade e mortalidade cardiovascular, progressão da RD e da ND em pacientes com DM tipo 2 com o polimorfismo que resulta na deleção no gene que codifica a glutathione S-transferase-teta (*GSTT1-0*) na população escocesa (78).

#### 1.7.4 *Gama-glutamilcisteína sintetase*

A enzima  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase ( $\gamma$ -CGS, também chamada de glutamato cisteína ligase) é um heterodímero composto por uma subunidade pesada (catalítica) e uma subunidade leve (regulatória). A subunidade catalítica é responsável pela atividade sintética e o gene que codifica essa subunidade, *GCLC*, localiza-se no cromossomo 6 e tem 16 exons. Os ROS aumentam a expressão dessa enzima. Já foi identificada uma região polimórfica caracterizada por números variáveis da repetição do trinucleotídeo GAG imediatamente a jusante do início da região codificadora. Estudos populacionais revelaram cinco alelos na população e estudos em linhagens celulares sugerem que esse polimorfismo tenha significado funcional, modificando as concentrações de glutathiona intracelular (79).

O polimorfismo -588C/T do gene *GCLC* (região 5' franqueadora) suprime a expressão induzida por ROS e está associado a baixas concentrações intracelulares de glutathiona. Esse polimorfismo foi relacionado a uma menor resposta vasodilatadora ao óxido nítrico em coronárias (80). Também foi descrito o polimorfismo -129C/T, que se correlacionou com o risco de infarto na população japonesa (81). Nesse trabalho, verificou-se uma frequência significativamente maior do alelo -129T em pacientes com infarto do miocárdio (28,2%) em relação a indivíduos-controle (17,3%). Os genótipos -129C/T e T/T foram significativamente relacionados a uma menor reatividade das artérias coronarianas epicárdicas após infusão de acetilcolina nos estudos de angiografia.

Quando as células são submetidas ao estresse oxidativo ou depleção de glutathiona, a expressão do gene *GCLC* é aumentada. No estudo japonês, foram

realizados ensaios de *gel-shift* com células endoteliais humanas, observando-se uma maior ligação de um fator de transcrição com o alelo C em um sítio próximo à posição -129, enquanto que, em presença do alelo T, houve uma fraca ligação do fator de transcrição. Dessa forma, é possível que o alelo -129T modifique a ligação de proteínas nucleares a elementos de ligação não identificados próximos à posição -129. Postula-se que o alelo -129T possa suprimir o aumento da expressão da enzima *GCLC* em resposta ao estresse oxidativo, possivelmente diminuindo a produção intracelular de glutathione (81).

#### **1.7.4.1 *Glutathione peroxidases***

O gene que codifica a glutathione peroxidase 1 (*GPX1*) localiza-se no cromossomo 3 (3p21.2) e possui dois exons. Uma região polimórfica caracterizada por números variáveis da repetição do trinucleotídeo GCG foi identificada no exon 1 desse gene (82). Em um estudo populacional de 110 alelos de 55 indivíduos não relacionados, as frequências dos alelos de quatro, cinco e seis repetições foram de 40%, 35% e 25%, respectivamente (82).

Esse polimorfismo no exon 1 foi avaliado em doença cardiovascular e em câncer de próstata, em dois diferentes estudos que demonstraram um discreto aumento do risco cardiovascular nos portadores do alelo com seis repetições de GCG (83) e uma ausência de correlação desse polimorfismo com câncer de próstata (84), respectivamente.

O gene que codifica a enzima glutathione peroxidase 3 (*GPX3*) está no cromossomo 5 (5q23) e possui cinco exons. A atividade diminuída dessa enzima foi

relatada em crianças com acidente vascular cerebral (85). Bierl e colaboradores estudaram os determinantes da transcrição do gene *GPX3* e redefiniram a região promotora desse gene, que possui sítios de ligação para fatores de transcrição, quais sejam: um elemento responsivo a metal (MER) na região -79 a -81, um sítio para ligação do fator de transcrição SP-1, na região -104 a -109, um elemento responsivo a antioxidantes (ARE), na região -148 a -158, e uma região para ligação do fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1), na posição -203 a -209 (Figura 3) (86).

O estudo funcional desta região promotora evidenciou um aumento de 25 vezes na atividade transcricional do gene *GPX3* e identificou a hipóxia como sendo um importante regulador da transcrição. Até o início de 2007, três SNP haviam sido descritos na região que compreende essa região promotora: um próximo ao sítio de ligação do HIF-1 (frequência de 2% na população americana) e dois próximos aos sítios de ligação do SP-1 e do MRE, com frequências de 1% e 16%, respectivamente, na população americana (87). Esses polimorfismos nunca haviam sido estudados em nenhuma doença; no entanto, por estarem na região promotora, poderiam afetar a atividade funcional do gene em questão.

O papel do estresse oxidativo na patogênese das complicações crônicas do DM vem sendo consistentemente demonstrado na literatura, e os genes que codificam enzimas que participam dos mecanismos antioxidantes são genes candidatos a conferirem suscetibilidade ou proteção contra as complicações crônicas, pois podem abrigar polimorfismos que, influenciando a concentração citoplasmática de compostos antioxidantes, poderiam modular a resposta celular à hiperglicemia. A glutatona é um dos mais importantes antioxidantes endógenos; no entanto, a associação entre polimorfismos em genes que codificam enzimas que

participam desse sistema e complicações crônicas do diabetes foi pouco explorada na literatura (76-78).

Com exceção da hiperglicemia e da hipertensão arterial sistêmica, não existem fatores preditivos para o desenvolvimento de complicações microvasculares em pacientes com DM. Assim, a busca de marcadores genéticos para identificar pacientes de risco torna-se importante, pois possibilita o rastreamento de pacientes com maior suscetibilidade para o desenvolvimento das complicações e intensificação do tratamento nessa população.

-441	agtaaatgffctggaagttaactcagctcttgetgaaatttaaacctcaattccagaggaccatcgccag	-366
-365	gtgffttaaaacctcgataggaataagaaatgcttcccagaatggagacttccatcagttctaggagctatta	-291
-290	gccccctgcccctggctgtaatggagaccgctgtgtctgctccittcgactttggagccaaaagaggaagg	-218
-217	gaccgctc <u>ccca</u> cgctccacagggacctgacttccactctctgccagatttgcctatg <u>tcactg</u> tcgcccg	-145
	<i>HIF-1</i> <span style="margin-left: 200px;"><i>ARE</i></span>	
-144	ggacggggaggtggggagctgagggcaagtgcg <u>cccc</u> ccctgaaatcccagccgctagcgattggc	-76
	<i>SP-1</i> <span style="margin-left: 100px;"><i>CCAAT</i></span>	
-75	<u>tgca</u> aggtctcggttggccgaggattggtcacaccgagggctgaaaggtggctgggagcgccggac	-6
	<i>MRE</i> ▼ <span style="margin-left: 10px;">↑</span>	
-5	acctcagacggacgggtggccagggatcaggcagcggctcaggcgacctgagtgtgccccacccgcc	64
65	ATGGCCCGGCTGCTGCAGGCGTCTGCCTGCTTTCCCTGCTCC	107

**Figura 3. Seqüência da região promotora do gene *GPX3* redefinida por Bierl *et al* (86)**

As seqüências assinaladas são locais de ligação de fatores de transcrição. A seta preta representa o sítio de início da transcrição. A seta vermelha indica um polimorfismo previamente descrito em 16% da população americana (- 65 T/C) (87). HIF- fator induzido por hipóxia-1, ARE - elemento responsivo a antioxidante, SP-1 - fator de transcrição Sp-1, um ativador transcripcional clássico, MRE - elemento responsivo a metal.



## **2 OBJETIVOS**

O objetivo desse trabalho foi estudar polimorfismos em genes que codificam as enzimas  $\gamma$ -CGS, GPX-1 e GPX-3 e sua associação com o desenvolvimento de nefropatia e retinopatia em pacientes diabéticos tipo 1. Para isso foram estudadas:

- A frequência do SNP localizado na posição -129 da região promotora do gene que codifica a enzima *GCLC*;
- A frequência dos alelos determinados pelo número de repetições do trinucleotídeo GCG presentes no exon 1 do gene que codifica a enzima GPX-1;
- A frequência do SNP localizado na posição -65 da região promotora do gene que codifica a enzima GPX-3.

### **3 MÉTODOS**

### **3.1 Protocolo Clínico**

Duzentos e noventa e nove pacientes (139 do gênero masculino e 160 do gênero feminino) com DM tipo 1 do Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, do Centro de Diabetes da Universidade Federal de São Paulo e do Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual de São Paulo (Iamsp) foram estudados no período entre outubro de 2004 a julho de 2008. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética das Instituições envolvidas e todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Esclarecido. Os pacientes foram classificados de acordo com a presença ou ausência de retinopatia e de nefropatia diabética. Os critérios de inclusão para os pacientes sem complicações microvasculares foram:

1. Pelo menos 15 anos do diagnóstico de DM;
2. Mau controle glicêmico persistente, definido por medidas de HbA<sub>1C</sub> pelo menos 2 pontos percentuais acima do valor de referência do método em anos consecutivos;
3. História de esquema de terapia insulínica prévia inadequada, por exemplo, uma dose diária de insulina basal.

Os pacientes foram entrevistados e examinados, e seus prontuários revisados para coleta das seguintes informações:

Dados pessoais, do diagnóstico de DM e de complicações relacionadas ao DM: gênero, idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de diagnóstico, glicemia ao diagnóstico, tempo para início da insulinização, presença de cetoacidose ao diagnóstico, controle glicêmico atual e progresso, história de complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia). Foram considerados portadores de DM tipo 1 os pacientes com história de diabetes após os 6 meses de vida que evoluíram em menos de 1 ano para necessidade de uso de insulina.

Doenças associadas: hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia tratada medicamentosamente e doença renal crônica de outras etiologias que não o DM;

Hábitos: tabagismo, atividade física, etilismo;

Medicações: uso de inibidores da enzima de conversora da angiotensina (IECA), de bloqueadores do receptor da angiotensina II (BRA) e de hipolipemiantes;

História familiar: antecedentes familiares de HAS, dislipidemia, DM tipo 1 e 2;

Exame físico: dados antropométricos e avaliação da pressão arterial com o paciente sentado;

Dados laboratoriais: média dos valores de HbA<sub>1C</sub> (DHPLC certificado pela NGSP-EUA (*National Glyco Hemoglobin Standardization Program*)) nos 6 anos anteriores à data da avaliação para verificar controle glicêmico progresso. A HbA<sub>1C</sub> foi normalizada para valor de referência de 6% utilizado atualmente pelo método de DHPLC. Os exames de HbA<sub>1C</sub> anteriores a 2003 foram realizados pelo método de imunoturbodimetria (Roche Diagnóstica), também certificado pela NGSP.

Foram realizadas medidas da glicemia de jejum, colesterol total, lipoproteína de alta densidade do colesterol (HDL-c) e triglicerídeos (TG) pelos respectivos

métodos enzimáticos (colorimétrico automatizado). As concentrações de lipoproteína de baixa densidade do colesterol (LDL-c) foram calculadas pelo uso da fórmula de Friedewald ou medidas diretamente (método cinético automatizado) na vigência de hipertrigliceridemia. Também foram avaliadas as concentrações de creatinina sérica (método cinético automatizado) e a EAU (nefelometria).

### **3.2 Definição das complicações**

Para análise da associação entre os polimorfismos nos genes *GCLC*, *GPXI* e *GPX3* e as complicações microvasculares, os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com a presença ou não de cada uma delas, conforme descrito a seguir.

#### **3.2.1 Complicações renais**

Foram excluídos pacientes com acometimento renal por outras doenças que não o DM, tais como hepatite por vírus C e lúpus eritematoso sistêmico.

##### **3.2.1.1 Nefropatia diabética**

EAU anormal, a partir de pelo menos duas dosagens de microalbuminúria positivas. Foram consideradas medidas de EAU isoladas corrigidas pela concentração de creatinina urinária ou medidas de EAU em amostras de urina de 12

e de 24 horas (Tabela 3). O RFG estimado (RFG<sub>e</sub>) foi obtido através da fórmula de Cokcroft-Gault (88).

**Tabela 3 - Classificação da nefropatia conforme valores de excreção urinária de albumina**

Condição	mg/g de creatinina*	µg/min	mg/24h
Normal	< 20	< 30	< 30
Microalbuminúria	≥ 20 a 200	≥ 30 a 300	≥ 30 a 300
Macroalbuminúria	≥ 200	≥ 300	≥ 300

\*amostra isolada de urina

Para avaliação da associação de ND com os polimorfismos estudados, foram realizados dois tipos de análises:

**1ª análise:** comparação entre dois grupos de pacientes: (1) EAU normal ou microalbuminúria e com RFG<sub>e</sub> ≥ 60 mL/min, considerados aqui como **sem ND avançada**; (2) pacientes com macroalbuminúria a proteinúria ou RFG<sub>e</sub> < 60 mL/min ou pacientes em terapia de substituição renal, com história de transplante isolado de rim ou de transplante duplo rim-pâncreas, considerados aqui como **ND avançada**.

**2ª análise:** comparação entre dois grupos de pacientes: (1) EAU normal na ausência de uso de IECA ou BRA e com RFG<sub>e</sub> ≥ 60 mL/min, considerados aqui como **sem ND**; (2) pacientes com algum grau de EAU (microalbuminúria a proteinúria) ou RFG<sub>e</sub> < 60 mL/min ou pacientes em terapia de substituição renal, com história de transplante isolado de rim ou de transplante duplo rim-pâncreas, considerados aqui como **ND incipiente a avançada**.

### 3.2.1.2 Doença renal crônica

A definição (Tabela 3) e a classificação (Tabela 4) da doença renal crônica (DRC) foram realizadas de acordo com os critérios do *National Kidney Foundation* (7). A anormalidade na composição urinária foi considerada pela presença de pelo menos microalbuminúria persistente. O RFGe foi obtido através da fórmula de Cockcroft-Gault (88).

**Tabela 4 - Definição da doença renal crônica conforme os critérios do *National Kidney Foundation***

Dano renal por $\geq 3$ meses, definido como anormalidade renal com ou sem diminuição do RFG, manifestado por um dos seguintes achados: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anormalidades patológicas ou</li> <li>- Marcadores de dano celular, incluindo anormalidades na composição urinária ou sanguínea, ou anormalidades em testes de imagem</li> </ul>
RFG $< 60$ mL/min/1,73m <sup>2</sup> , com ou sem dano renal.
RFG – ritmo de filtração glomerular.

**Tabela 5 - Estágios da doença renal crônica conforme os critérios do *National Kidney Foundation***

Estágio	Descrição	RFG (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )
1	Dano renal, com o RFG normal ou aumentado	$\geq 90$
2	Dano renal com leve diminuição do RFG	60 – 89
3	Diminuição moderada do RFG	30 – 59
4	Diminuição grave do RFG	15 – 29
5	DRC terminal	$< 15$ ou em terapia dialítica

RFG – ritmo de filtração glomerular; DRC – doença renal crônica.



Para avaliação da associação de DRC com os polimorfismos estudados, os pacientes foram divididos em dois grupos: (1) pacientes sem DRC a DRC estágio 2; (2) pacientes com DRC estágios 3 a 5 ou com história de transplante isolado de rim ou de transplante duplo rim-pâncreas.

### **3.2.2 Retinopatia diabética**

A avaliação da RD foi obtida pelo exame de fundo de olho realizado por um médico oftalmologista. Os pacientes foram divididos em dois grupos para análise de associação com os polimorfismos estudados: (1) pacientes sem história de RDP ou de fotocoagulação com *laser*; (2) pacientes com RDNP grave ou RDP prévia ou atual ou história de fotocoagulação com *laser*.

### **3.3 Genotipagem**

Após a obtenção do Termo de Consentimento Pós-Informado, foram colhidos 15 mL de sangue periférico de cada um dos pacientes e de controles não diabéticos para a extração do DNA genômico a partir de leucócitos e posterior genotipagem de cada um dos genes estudados.

### 3.4 Extração do DNA genômico

Em um tubo graduado, foram acrescentados 15 mL de Tris EDTA (TE) (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) para cada 5 mL de sangue total. O tubo foi homogeneizado manualmente e, a seguir, centrifugado a 1.500g durante 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* formado foi lavado em 15 mL de TE até sua dissolução total.

Após a lavagem, foi realizada nova centrifugação, e o sobrenadante foi desprezado. Essa lavagem foi repetida quatro vezes, até que o *pellet* assumisse coloração esbranquiçada. Em seguida, foram adicionados ao *pellet*:

- 3 mL de Tampão A (25mM de EDTA e 75 mM de NaCl)
- 200 µL de sódio dodecil sulfato (SDS) 10% (Sigma)
- 100 µL de Proteinase K (Sigma)

Essa solução foi incubada por 12 h a 37°C e, após esse intervalo, foi adicionado 1 mL de NaCl 5M. Após agitação vigorosa durante 30 min, o tubo foi centrifugado a 2.500g durante 15 min, o *pellet* desprezado e o sobrenadante recolhido em novo tubo.

Dez mL de etanol absoluto (Merck) gelado foram adicionados ao tubo, com posterior homogenização por inversão até o aparecimento de um precipitado fibrilar que foi transferido para novo tubo tipo *eppendorff* 1,5 mL e seco em temperatura ambiente durante 30 min. O *pellet* foi ressuspenso em 50 – 200 µL H<sub>2</sub>O miliQ estéril e incubado a 37°C durante 15 min. A quantificação do DNA foi determinada por espectrofotometria (GeneQuant DNA/RNA Calculator, Pharmacia, LKC Biotechnology, Uppsala, Suécia). O DNA assim obtido foi armazenado à temperatura de -20 °C.

### 3.4.1 Reação em cadeia da polimerase

As reações para amplificação dos fragmentos de interesse dos genes *GCLC*, *GPX1* e *GPX3* foram realizadas com os *primers* descritos na Tabela 6. Para a amplificação do gene *GPX1*, o *primer forward* foi marcado na extremidade 5' com o fluorocromo 6-FAM. O protocolo que a seguir foi utilizado para amplificação dos três genes: 500 ng de DNA; 0,4  $\mu$ M de cada um dos *primers*; 0,2 mM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (GE Healthcare, Little Chalfont, UK); 1M de betaína (Sigma) (0,5M para a amplificação do *GPX3*); 1,5 U da enzima Taq DNA polimerase (GE Healthcare) e tampão da enzima 1X (50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de TRIS-HCL) para um volume final de reação de 50  $\mu$ L. A PCR foi realizada no termociclador MJ Research INC (PerkinElmer Cetus, Emeryville, EUA), como segue: um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 4 min, 35 ciclos de desnaturação (94°C por 30 s), *annealing* (55°C por 45 s para os genes *GCLC* e *GPX1* e 57°C por 45 s para o gene *GPX3*) e extensão (72°C por 1 min e 30 s). Após os ciclos de amplificação, as amostras foram incubadas a 72°C por 5 min (alongamento).

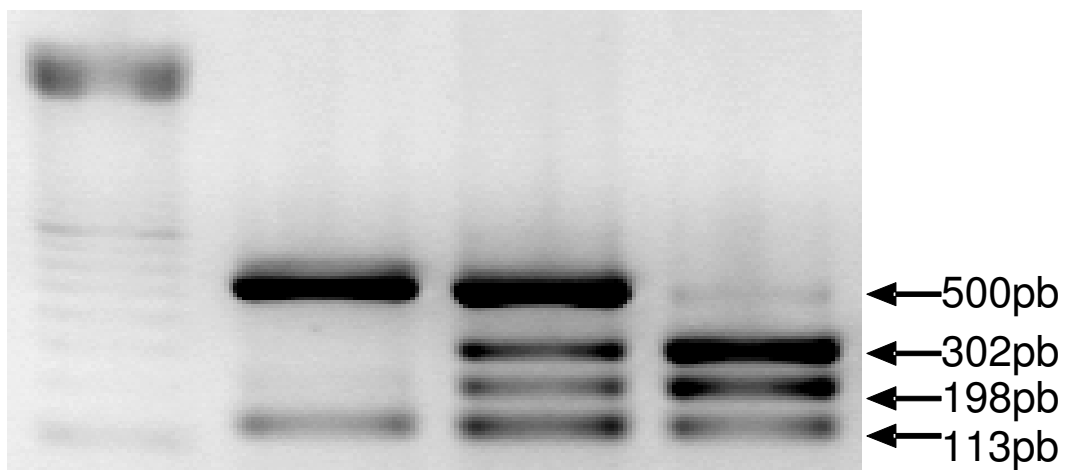
**Tabela 6 - Primers utilizados nas reações em cadeia da polimerase e tamanho dos fragmentos de DNA amplificados**

<b>Gene</b>	<b><i>Primers forward</i></b>	<b><i>Primers reverse</i></b>	<b>Tamanho do fragmento amplificado</b>
<i>GCLC</i>	5'- TCGTCCCAAGTCTCACAGTC -3'	5'- CGCCCTCCCCGCTGCTCCTC -3'	613 pb
<i>GPX1</i>	5'- CAATTGCGCCATGTGTGCTGCTC -3'	5'- TCGTTCATCTTGGTGTAGTCCCG -3'	192 pb
<i>GPX3</i>	5'- CCTGACTTCCACCTCTCTGC -3'	5'- CGCCCTCCCCGCTGCTCCTC -3'	200 pb

pb – pares de bases.

### 3.4.2 Genotipagem do gene *GCLC*

O polimorfismo - 129 C/T presente na região promotora do gene que codifica a enzima  $\gamma$ -CGS cria um sítio de restrição para a enzima *Tsp45I*, que já contém um sítio de restrição para essa mesma enzima (usado como controle da reação de digestão enzimática). Após a PCR, os fragmentos obtidos foram submetidos à digestão com a enzima *Tsp45I* por 24 h a 37°C, na qual foram utilizados 24  $\mu$ L do produto de PCR, 1U da enzima *Tsp45I* (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Alemanha) 1X do tampão R e 1X tampão *Tango* para um volume final de reação de 30  $\mu$ L. Sete microlitros do produto da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídeo a 100 Volts por aproximadamente 45 min e as bandas foram visualizadas com luz ultravioleta (GelDoc 1000 Video Gel Documentation System, BioRad Laboratories Inc., Richmond, EU). O polimorfismo foi determinado pela técnica de polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP): portadores do alelo C possuem um sítio de restrição para a enzima *Tsp45I* e a presença de alelo T cria um segundo sítio de restrição para a mesma enzima. Os indivíduos homocigotos CC são identificados pela presença de duas bandas, de 500 e 113 pares de bases; os homocigotos TT pela presença de três bandas, de 302, 198 e 113 pares de bases e os indivíduos heterocigotos CT pela presença de quatro bandas, de 500, 302, 198 e 113 pares de bases (Figura 4). A genotipagem do polimorfismo -129 C/T também foi realizada em 141 indivíduos-controle não diabéticos.

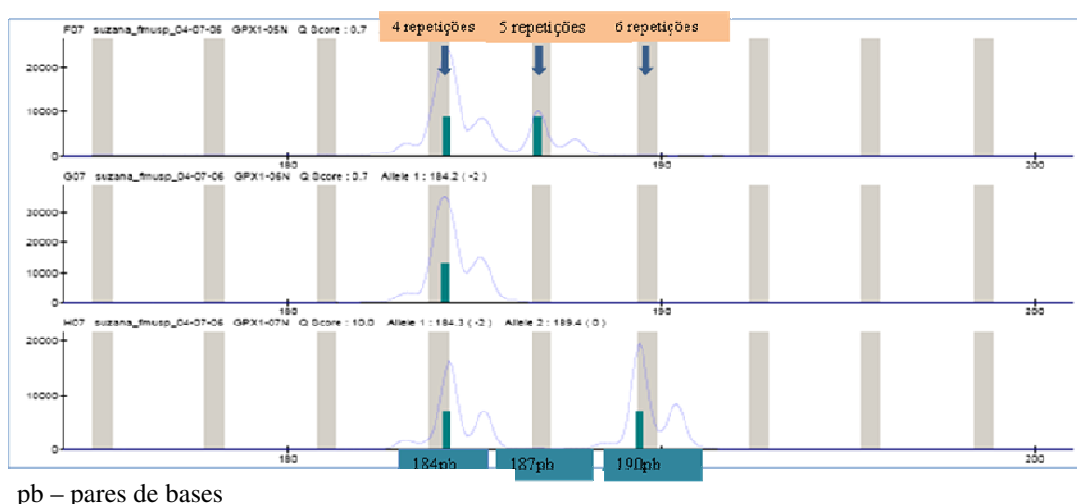


M - marcador de peso molecular de 100 pb; pb – pares de base.

**Figura 4.** Gel de agarose representativo dos três genótipos do polimorfismo -129 C/T na região promotora do gene *GCLC*.

### 3.4.3 Genotipagem do gene *GPXI*

Dez microlitros do produto de PCR do gene *GPXI* de cada amostra foram enviados para o Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. Cinco  $\mu$ L do produto de PCR de cada uma das amostras foram submetidos à eletroforese no equipamento MegaBACE (Amersham, GE Healthcare), utilizando-se o marcado *MegaBACE ET-550R Size Standard* (GE Healthcare), marcado com ROX, que possui fragmentos que variam de 60 a 550 pares de base. O *Size Standard* foi adicionado a cada um dos orifícios da placa de corrida, que corresponde a um capilar. O *software* usa o *Size Standard* para criar uma curva para cada capilar analisado. Posteriormente, os dados foram analisados pelo *software Genetic Profiler* para determinação do tamanho dos alelos. Foram gerados os perfis (cromatogramas) de cada uma das amostras testadas, conforme exemplificado na Figura 5.



**Figura 5. Representação do resultado da genotipagem do gene *GPXI* com os três possíveis tamanhos de fragmentos amplificados.**

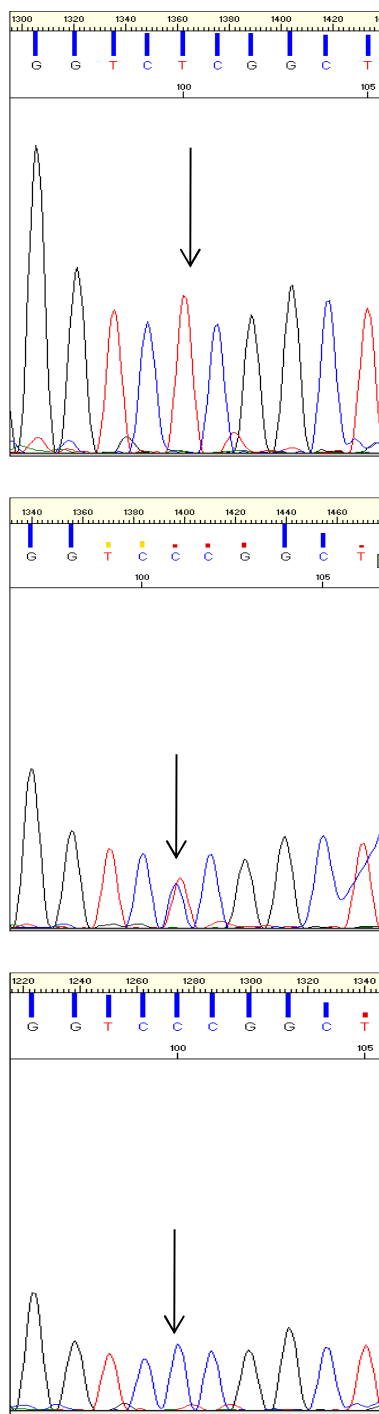
#### 3.4.4 Genotipagem do gene *GPX3*

Os produtos de PCR foram amplificados e seqüenciados no equipamento ABI 3130 XL (Applied BioSystem, Foster City, EU) de acordo com os procedimentos recomendados no manual do *kit BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction*, conforme descrição a seguir: a reação foi realizada em volume final de 10 µL contendo 20 ng do produto de PCR; 2 µL de *BigDye Terminator*; 2,0 pMol do *primer forward* e 2 µL do tampão. A reação foi realizada no termociclador MJ Research INC (PerkinElmer Cetus), conforme o protocolo seguinte: 25 ciclos de desnaturação (96°C por 10 s), *annealing* (50°C por 5 s) e extensão (60°C por 4 min).

Os produtos foram purificados segundo esse protocolo: a cada reação de seqüenciamento foram adicionados 10 µL de água e 30 µL de etanol absoluto. A mistura foi incubada por 15 min à temperatura ambiente e, após esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 14.000 rpm. Em seguida, foram adicionados 100 µL de etanol 70% às amostras, que foram novamente centrifugadas à temperatura ambiente por 10 min. As amostras foram secas, ressuspensas em 10 µL de formamida deionizada e aplicadas no seqüenciador automático.

Na Figura 6 estão demonstrados exemplos de eletroferogramas de cada um dos três possíveis genótipos (TT, TC ou CC).





**Figura 6. Eletroferogramas representativos de cada um dos três possíveis genótipos (TT, TC e CC, respectivamente) referentes ao polimorfismo localizado na posição - 65 da região promotora do gene que codifica a enzima GPX-3**

### 3.5 *Análise estatística*

As variáveis contínuas foram expressas como mediana (med) e intervalo interquartil (percentil 25% a 75%) e as variáveis categóricas foram expressas como número de casos e porcentagem de indivíduos afetados. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi determinado usando-se a frequência dos alelos através do teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson. O programa SPSS 13.0 foi utilizado para a análise dos dados.

Para a comparação das medianas das variáveis contínuas relativas às características clínicas entre os grupos estudados, foi utilizado o Teste de Mann-Whitney para amostras independentes. O teste do  $\chi^2$  de Pearson também foi utilizado para avaliar a frequência dos polimorfismos entre os pacientes diabéticos e os controles não diabéticos, as diferenças nas variáveis categóricas relativas às características clínicas iniciais entre os dois grupos de diabéticos estudados, bem como a associação da presença dos polimorfismos nos genes *GCLC*, *GPX1* e *GPX3*, haplótipos dos genes *GCLC* e *GPX3* com as complicações estudadas.

Para os genes *GCLC* e *GPX3*, os genótipos homozigóticos de menor frequência foram analisados juntamente com os heterozigotos.

A magnitude do risco conferido por cada variável significativamente diferente foi estimada usando *Odds Ratio* (*OR*) com intervalo de confiança (*IC*) de 95% calculado pela análise de regressão logística binária. Para estimar a *OR* ajustada, uma análise de regressão logística binária foi realizada com as variáveis independentes

iniciais significativamente diferentes para a variável dependente em questão. O nível de significância adotado ( $p$ ) foi de 0,05 (bi-caudal).

Uma vez que o cálculo do tamanho da amostra não foi realizado *a priori*, o poder da amostra para determinar diferença correspondente a 95% do IC foi calculado *a posteriori* a partir das diferenças percentuais dos genótipos em relação às diferentes variáveis dependentes estudadas na análise univariada.

## **4 RESULTADOS**

#### **4.1 Caracterização dos pacientes de acordo com a presença ou ausência das complicações estudadas**

##### **4.1.1 Complicações renais**

###### **4.1.1.1 Nefropatia diabética**

###### ***Análise de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética avançada***

Para essa avaliação, foram considerados 252 pacientes com DM tipo 1 divididos em dois grupos: com ou sem ND avançada, conforme definido no item 4.2.1 de Material e Métodos. As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo 1 de acordo com a presença ou ausência de ND avançada estão descritas na Tabela 7.

Os pacientes com ND avançada tinham idade mais avançada (38,0 *versus* 32,1;  $p < 0,001$ ) e maior tempo de DM (23,6 *versus* 20,4;  $p < 0,001$ ) que os pacientes sem ND avançada.

As frequências de HAS tratada (48,2% *versus* 22,9%;  $p < 0,001$ ), dislipidemia tratada (25,0% *versus* 13,6%;  $p = 0,021$ ), RDP (64,3% *versus* 25,4%;  $p < 0,001$ ) e uso de BRA (17,0% *versus* 1,4%;  $p < 0,001$ ) também foram significativamente maiores nos pacientes com ND avançada.

A medida da pressão arterial sistólica (PAS) (130,0 *versus* 110,0;  $p < 0,001$ ), da pressão arterial diastólica (PAD) (80,0 *versus* 70,0;  $p = 0,001$ ), e a concentração de TG (96,0 *versus* 79,0;  $p = 0,006$ ) foram significativamente maiores no grupo com ND avançada. Ao contrário, o índice de massa corpórea (IMC) (22,0 *versus* 22,9;  $p < 0,018$ ) foi significativamente menor no grupo com ND avançada. As demais variáveis não apresentaram diferenças significantes entre os dois grupos.

Após análise multivariada, HAS tratada ( $OR = 2,51$ ; IC 95% = 1,52 – 5,50;  $p = 0,021$ ) e dislipidemia tratada ( $OR = 2,97$ ; IC 95% = 1,30 – 6,80;  $p = 0,01$ ) conferiram risco para a presença de ND avançada, enquanto o maior valor do IMC teve um papel protetor ( $OR = 0,79$ ; IC 95% = 0,70 – 0,89;  $p = 0,021$ ) (Tabela 8).

**Tabela 7 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo 1 de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND) avançada**

<b>Variáveis</b>	<b>Sem ND avançada n =140</b>	<b>Com ND avançada n = 112</b>	<b>Valor de p</b>
Gênero, (M/F)	73/67	46/66	NS
Raça,(caucasóide/negróide/outros)	126/11/3	101/8/3	NS
Idade em anos, med (IIQ)	32,1 (24,5 – 41,5)	38,0 (30,4 – 45,9)	<0,001
Idade ao diagnóstico em anos, med,(IIQ)	11,0 (4 – 18)	12,0 (8,0 – 19,0)	NS
Tempo de diabetes em anos, med (IIQ)	20,4 (17,0 – 24,1)	23,6 (19,0 – 31,5)	<0,001
Tabagismo, n (%)	9 (6,4)	12 (10,7)	NS
HAS tratada, n (%)	32 (22,9)	54 (48,2)	<0,001
Dislipidemia tratada, n (%)	19 (13,6)	28 (25,0)	0,021
RDP, n (%)	35 (25,4)	72 (64,3)	<0,001
Uso de IECA, n (%)	36 (25,7)	39 (34,8)	NS
Uso de BRA, n (%)	2 (1,4)	19 (17,0)	<0,001
IMC em kg/m <sup>2</sup> , med (IIQ)	22,9 (21,2 – 26,0)	22,0 (20,7 – 24,3)	0,018
PAS em mmHg, med (IIQ)	110,0 (108,2 – 130,0)	130,0 (110,0 – 140,0)	<0,001
PAD em mmHg, med (IIQ)	70,0 (70,0 – 80,0)	80,0 (70,0 – 90,0)	0,001
HbA <sub>1c</sub> em %, med (IIQ)	8,9 (8,2 – 10,0)	8,7 (7,7 – 9,7)	NS
COL total em mg/dL, med (IIQ)	174,0 (149,0 – 200,0)	182,0 (152,0 – 212,5)	NS
HDL-c em mg/dL, med (IIQ)	56,0 (48,0 – 68,2)	55,0 (45,3 – 65,5)	NS
LDL-c em mg/dL, med (IIQ)	91,0 (78,0 – 118,0)	98,0 (77,7 – 127,5)	NS
TG em mg/dL, med (IIQ)	79,0 (59,0 – 113,0)	96,0 (70,0 – 129,7)	0,006

Os resultados estão expressos em mediana (med) e intervalo interquartilico (IIQ) para variáveis contínuas e número de casos e porcentagem para variáveis categóricas. Foram utilizados os testes de  $\chi^2$  de Pearson para variáveis categóricas e de Mann-Whitney para variáveis contínuas. HAS – hipertensão arterial sistêmica; RDP – retinopatia diabética proliferativa; IECA – inibidor da enzima de conversora de angiotensina; BRA – bloqueador do receptor da angiotensina II; IMC – índice de massa corpórea; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; COL – colesterol total; HDL-c – lipoproteína de alta densidade do colesterol; LDL-c – lipoproteína de baixa densidade do colesterol; TG – triglicerídeos.

**Tabela 8 - Regressão logística binária para nefropatia diabética avançada**

<b>Variáveis</b>	<b>OR</b>	<b>IC (95%)</b>	<b>Valor de <i>p</i></b>
Idade atual	1,01	0,97 -1,05	NS
Tempo de diabetes	1,06	1,00 – 1,13	0,044
<b>HAS tratada</b>	<b>2,51</b>	<b>1,52 – 5,50</b>	<b>0,021</b>
<b>Dislipidemia tratada</b>	<b>2,97</b>	<b>1,30 – 6,80</b>	<b>0,010</b>
<b>IMC</b>	<b>0,79</b>	<b>0,70 -0,89</b>	<b>&lt;0,001</b>
PAS	1,02	0,99 – 1,05	NS
PAD	1,01	0,96 -1,06	NS
TG	1,00	0,99 – 1,00	NS

*OR* – odds ratio; *IC* – intervalo de confiança; *HAS* – hipertensão arterial sistêmica; *PAS* – pressão arterial sistólica; *PAD* – pressão arterial diastólica; *IMC* – índice de massa corpórea; *TG* – triglicéridos.



### ***Análise de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética***

Para essa avaliação, foram considerados 235 pacientes com DM tipo 1 divididos em dois grupos: com ou sem ND, conforme definido no item 3.2.1.1 de Material e Métodos. As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo 1 de acordo com a presença ou ausência de ND estão descritas na Tabela 9.

Os pacientes portadores de ND (incipiente a avançada) tinham idade mais avançada (36,0 *versus* 31,6;  $p = 0,01$ ), maior idade ao diagnóstico de DM (13,0 *versus* 10,0;  $p = 0,041$ ) e maior tempo de DM (22,0 *versus* 20,0;  $p = 0,027$ ) que os pacientes sem ND.

As frequências de HAS tratada (39,5% *versus* 21,9%;  $p = 0,008$ ), dislipidemia tratada (23,5% *versus* 9,6%;  $p = 0,012$ ) e RDP (51,3% *versus* 19,4%;  $p < 0,001$ ) foram significativamente maiores nos pacientes portadores de ND.

As medidas da PAS (120,0 *versus* 110,0;  $p = 0,001$ ) e da PAD (80,0 *versus* 70;  $p < 0,004$ ) e a concentração de TG (95,0 *versus* 70,5;  $p = 0,001$ ) também foram maiores no grupo com ND.

A concentração de HbA<sub>1C</sub> foi menor no grupo com ND (8,7 *versus* 9,5;  $p = 0,018$ ). As demais variáveis não apresentaram diferenças significantes entre os dois grupos.

Após ajuste por análise multivariada, apenas a dislipidemia tratada ( $OR = 3,21$ ; IC 95% = 1,21 – 8,46;  $p = 0,018$ ) conferiu risco para a presença de ND na população estudada (Tabela 10).

**Tabela 9 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo 1 de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND)**

Variáveis	Sem ND n =73	Com ND incipiente a avançada n = 162	Valor de p
Gênero (M/F)	38/35	73/89	NS
Raça (caucasóide/negróide)	65/5/3	146/13/3	NS
Idade, anos, med (IIQ)	31,6 (23,4 – 42,0)	36,0 (28,9 -43,9)	0,01
Idade ao diagnóstico, anos, med (IIQ)	10,0 (3,0 – 18,5)	13,0 (8,0 – 18,0)	0,041
Tempo de diabetes, anos, med (IIQ)	20,0 (17,3 – 23,8)	22,0 (17,8 - 26,4)	0,027
Tabagismo, n (%)	6 (8,2)	15 (9,3)	NS
HAS tratada, n (%)	16 (21,9)	64 (39,5)	0,008
Dislipidemia tratada, n (%)	7 (9,6)	38 (23,5)	0,012
RDP, n (%)	14 (19,4)	88 (51,3)	<0,001
IMC, kg/m <sup>2</sup> , med (IIQ)	22,3 (20,5 – 24,9)	22,5 (20,9 – 24,7)	NS
PAS, mmHg, med (IIQ)	110,0 (100,0 – 130,0)	120,0 (110,0 – 140,0)	0,001
PAD, mmHg, med (IIQ)	70,0 (70,0 – 80,0)	80,0 (70,0 – 90,0)	0,004
HbA <sub>1c</sub> , %, med (IIQ)	9,3 (8,3 – 10,3)	8,7 (7,8 – 9,8)	0,018
COL total, mg/dL, med (IIQ)	173,0 (146,5 – 49,5)	180,5 (152,0 – 206,0)	NS
HDL-c, mg/dL, med (IIQ)	56,0 (49,5 – 66,0)	56,0 (44,7 – 69,0)	NS
LDL-c, mg/dL, med (IIQ)	90,0 (77,0 – 121,0)	97,0 (78,0 - 122,0)	NS
TG, mg/dL, med (IIQ)	70,5 (57,2 – 109,7)	95,0 (69,0 – 129,7)	0,005

Os resultados estão expressos em mediana (med) e intervalo interquartil (IIQ) para variáveis contínuas e número de casos e porcentagem para variáveis categóricas. Foram utilizados os testes de  $\chi^2$  de Pearson para variáveis categóricas e de Mann-Whitney para variáveis contínuas. HAS – hipertensão arterial sistêmica; RDP – retinopatia diabética proliferativa; IECA – inibidor da enzima de conversora da angiotensina; BRA – bloqueador do receptor da angiotensina II; IMC – índice de massa corpórea; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; COL – colesterol total; HDL-c – lipoproteína de alta densidade do colesterol; LDL-c – lipoproteína de baixa densidade do colesterol; TG – triglicerídeos.

**Tabela 10 - Regressão logística binária para nefropatia diabética incipiente a avançada**

<b>Variáveis</b>	<b>OR</b>	<b>IC (95%)</b>	<b>Valor de <i>p</i></b>
Idade atual	0,96	0,84 – 1,10	NS
Idade de diagnóstico	1,52	0,92 – 1,20	NS
Tempo de diabetes	1,08	0,94 – 1,23	NS
HAS tratada	1,30	0,59 – 2,84	NS
<b>Dislipidemia tratada</b>	<b>3,21</b>	<b>1,21 – 8,46</b>	<b>0,018</b>
PAS	1,01	0,98 – 1,05	NS
PAD	1,00	0,96 – 1,05	NS
TG	1,00	0,99 – 1,00	NS

*OR* – odds ratio; IC – intervalo de confiança; HAS – hipertensão arterial sistêmica; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica, TG – triglicerídeos.

### *Análise de acordo com o estágio da doença renal crônica*

Para essa avaliação, foram considerados 253 pacientes com DM divididos em dois grupos de acordo com o estágio da DRC, conforme definido no item 3.2.1.2 de Material e Métodos. As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo 1 de acordo com o estágio da DRC estão descritas na Tabela 11.

Os pacientes portadores de DRC estágios 3 a 5 eram predominantemente do gênero feminino (67% *versus* 45,8%;  $p = 0,001$ ), tinham idade mais avançada (40,0 *versus* 32,0;  $p < 0,001$ ) e apresentavam maior tempo de DM (25,0 *versus* 20,5;  $p < 0,001$ ) que os pacientes sem DRC a DRC estágio 2.

As freqüências de HAS tratada (48,2% *versus* 26,9%;  $p = 0,001$ ), RDP (70,6% *versus* 28,6%;  $p < 0,001$ ) e uso de BRA (16,5% *versus* 4,2%;  $p = 0,001$ ) foram significativamente maiores nos pacientes com DRC estágios 3 a 5.

A medida da PAS (130,0 *versus* 120,0;  $p = 0,001$ ) e a concentração de TG (97,0 *versus* 82,0;  $p = 0,024$ ) foram significativamente maiores, enquanto o IMC (21,8 *versus* 23,0;  $p = 0,008$ ) foi significativamente menor nos pacientes com DRC estágios 3 a 5. As demais variáveis não apresentaram diferenças significantes entre os dois grupos.

Após ajuste por análise multivariada, o gênero feminino ( $OR = 2,99$ ; IC 95% = 1,37 – 6,52;  $p = 0,006$ ) e a HAS tratada ( $OR = 2,83$ ; IC 95% = 1,25 – 6,41;  $p = 0,012$ ) conferiram risco para a presença de DRC estágios 3 a 5, enquanto o maior valor de IMC teve um papel protetor ( $OR = 0,78$ ; IC 95% = 0,68 – 0,89;  $p < 0,001$ ) (Tabela 12).

**Tabela 11 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo1 de acordo com o estágio da doença renal crônica (DRC)**

<b>Variáveis</b>	<b>Sem DRC a DRC estágio 2 n = 168</b>	<b>Com DRC estágios 3 a 5 n = 85</b>	<b>Valor de p</b>
Gênero (M/F)	91/77	28/57	0,001
Raça (caucasóide/negróide/outros)	152/12/4	76/7/2	NS
Idade, anos, med (IIQ)	32,0 (24,5 – 41,9)	40,0 (32,1 – 48,0)	< 0,001
Idade ao diagnóstico, anos, med (IIQ)	11,0 (5,0 – 18,0)	13,0 (8,0 – 19,0)	NS
Tempo de diabetes, anos	20,5 (17,0 – 24,0)	25,0 (19,5 – 32,3)	< 0,001
Tabagismo atual, n (%)	13 (7,7)	8 (9,4)	NS
HAS tratada, n (%)	45 (26,9)	41 (48,2)	0,001
Dislipidemia tratada, n (%)	29 (17,3)	18 (21,2)	NS
RDP, n (%)	48 (28,6)	60 (70,6)	<0,001
Uso de IECA, n (%)	48 (28,6)	27 (31,8)	NS
Uso de BRA, n (%)	7 (4,2)	14 (16,5)	0,001
IMC, kg/m <sup>2</sup> , med (IIQ)	23,0 (21,0 – 25,9)	21,8 (2,6)	0,008
PAS, mmHg, med (IIQ)	120,0 (110,0 – 130,0)	130,0 (110,0 – 140,0)	0,001
PAD, mmHg, med (IIQ)	80,0 (70,0 – 80,0)	80,0 (70,0 – 90,0)	NS
HbA <sub>1c</sub> , %, med (IIQ)	8,9 (8,1 – 10,0)	8,6 (7,8 – 9,7)	NS
COL total, mg/dL, med (IIQ)	175,0 (149 – 206,0)	178,0 (153,0 – 204,0)	NS
HDL-c, mg/dL, med (IIQ)	56,0 (48,0 – 68,0)	55,0 (43,0 – 66,0)	NS
LDL-c, mg/dL, med (IIQ)	92,5 (77,0 – 123,5)	95,5 (78,0 – 118,)	NS
TG, mg/dL, med (IIQ)	82,0 (61,0 – 120,0)	97,0 (92,1)	0,024

Os resultados estão expressos em mediana (med) e intervalo interquartilico (IIQ) para variáveis contínuas e número de casos e porcentagem para variáveis categóricas. Foram utilizados os testes de  $\chi^2$  de Pearson para variáveis categóricas e de Mann-Whitney para variáveis contínuas. HAS – hipertensão arterial sistêmica; RDP – retinopatia diabética proliferativa; IECA – inibidor da enzima de conversora da angiotensina; BRA – bloqueador do receptor da angiotensina II; IMC – índice de massa corpórea; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; COL – colesterol total; HDL-c – lipoproteína de alta densidade do colesterol; LDL-c – lipoproteína de baixa densidade do colesterol; TG – triglicérides.

**Tabela 12 - Análise de regressão logística binária para doença renal crônica estágios 3 a 5**

<b>Variáveis</b>	<b>OR</b>	<b>IC (95%)</b>	<b>Valor de <i>p</i></b>
<b>Gênero (F)</b>	<b>2,99</b>	<b>1,37 – 6,52</b>	<b>0,006</b>
Idade atual	1,02	0,97 – 1,07	NS
Tempo de diabetes	1,07	1,01 – 1,14	0,022
<b>HAS tratada</b>	<b>2,83</b>	<b>1,25 – 6,41</b>	<b>0,012</b>
<b>IMC</b>	<b>0,78</b>	<b>0,68 – 0,89</b>	<b>&lt;0,001</b>
PAS	1,02	0,99 – 1,04	NS
TG	1,00	0,99 – 1,00	NS

OR – Odds ratio; IC- intervalo de confiança; F – feminino; HAS – hipertensão arterial sistêmica; IMC – índice de massa corpórea; PAS – pressão arterial sistólica.

#### ***4.1.2 Análise de acordo com a presença ou ausência de retinopatia diabética proliferativa***

Para essa avaliação, foram considerados 285 pacientes com DM divididos em dois grupos de acordo com presença ou ausência de RDP, conforme definido no item 3.2.2 de Material e Métodos. As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo 1, de acordo com a presença ou ausência de RDP, estão descritas na Tabela 13.

Os pacientes portadores de RDP tinham idade mais avançada (38,5 *versus* 31,0;  $p < 0,001$ ) e maior duração do DM (24,0 *versus* 20,1  $\pm$  7,4;  $p < 0,001$ ) que os pacientes sem RDP. HAS tratada (43,2 % *versus* 23,1%;  $p < 0,001$ ), DRC estágios 3 a 5 (47,2% *versus* 10,9%,  $p < 0,001$ ) e uso de IECA (36,8% *versus* 23,8%;  $p = 0,024$ ) foram significativamente mais frequentes nos pacientes do grupo com RDP.

As medidas de PAS (120,0 *versus* 118,0;  $p < 0,001$ ), PAD (80,0 *versus* 75,0;  $p = 0,013$ ) e a concentração de TG (96,0 *versus* 75,5;  $p = 0,001$ ) também foram maiores nos pacientes com RDP.

A HbA<sub>1C</sub> foi significativamente maior no grupo de pacientes sem RDP em relação ao grupo de pacientes com RDP (9,1% *versus* 8,4%,  $p < 0,001$ ).

Após ajuste por análise multivariada, a presença de HAS ( $OR = 1,97$ ; IC 95% = 1,02 – 3,78;  $p = 0,041$ ) foi a única variável independente que conferiu risco para a presença de RDP (Tabela 14).

**Tabela 13 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo 1 de acordo com a presença ou ausência de retinopatia diabética proliferativa (RDP)**

Variáveis	Sem RDP n = 160	Com RDP n = 125	Valor de p
Gênero (M/F)	80/80	52/73	NS
Raça (caucasóide/negróide/outras)	143/13/4	110/11/4	NS
Idade, anos, med (IIQ)	31,0 (24,0 – 42,0)	38,5 (32,1 – 45,1)	< 0,001
Idade ao diagnóstico, anos, med (IIQ)	11,0 (4,0 – 19,0)	12,5 (9,0 – 20,0)	NS
Tempo de diabetes, anos, med (IIQ)	20,1 (16,9 – 23,9)	24,0 (19,0 – 29,0)	< 0,001
Tabagismo atual, n (%)	13 (8,1)	13 (10,4)	NS
HAS tratada, n (%)	37 (23,1)	54 (43,2)	0,001
Dislipidemia tratada, n (%)	21 (13,1)	25 (20,0)	NS
DRC estágios 3 a 5, n (%)	19 (10,9)	29 (47,2)	< 0,001
Uso de IECA, n (%)	38 (23,8)	46 (36,8)	0,024
Uso de BRA, n (%)	8 (5,0)	13 (10,4)	NS
IMC, kg/m <sup>2</sup> , med (IIQ)	22,4 (5,0)	22,4 (21,2 – 25,3)	NS
PAS, mmHg, med (IIQ)	118,0 (18,3)	120,0 (110,0 – 140,0)	< 0,001
PAD, mmHg, med (IIQ)	75,0 (11,7)	80,0 (70,0 – 90,0)	0,013
HbA <sub>1C</sub> , %, med (IIQ)	9,1 (2,1)	8,4 (7,4 – 9,5)	< 0,001
COL total, mg/dL, med (IIQ)	173,0 (149,0 – 198,0)	184,5 (155,5 – 212,5)	NS
HDL-c, mg/dL, med (IIQ)	57,0 (48,0 – 70,0)	56,5 (45,0 – 66,5)	NS
LDL-c, mg/dL, med (IIQ)	91,0 (77,0 – 117,0)	104,0 (80,0 – 125,0)	NS
TG, mg/dL, med (IIQ)	75,5 (57,2 – 110,7)	96,0 (59,7 – 149,5)	0,001

Os resultados estão expressos em mediana (med) e intervalo interquartil (IIQ) para variáveis contínuas e número de casos e porcentagem para variáveis categóricas. Foram utilizados os testes de  $\chi^2$  de Pearson para variáveis categóricas e de Mann-Whitney para variáveis contínuas. HAS – hipertensão arterial sistêmica; IECA – inibidor da enzima de conversora da angiotensina; BRA – bloqueador do receptor da angiotensina II; IMC – índice de massa corpórea; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; COL – colesterol total; HDL-c – lipoproteína de alta densidade do colesterol; LDL-c – lipoproteína de baixa densidade do colesterol; TG – triglicerídeos.



**Tabela 14 - Regressão logística binária para retinopatia diabética proliferativa**

<b>Variáveis</b>	<b>OR</b>	<b>IC (95%)</b>	<b>Valor de <i>p</i></b>
Idade	1,02	0,98 – 1,06	NS
Tempo de diabetes	1,05	1,00 – 1,10	NS
<b>HAS tratada</b>	<b>1,97</b>	<b>1,02 – 3,78</b>	<b>0,041</b>
PAS	1,00	0,97 – 1,02	NS
PAD	1,01	0,97 – 1,05	NS
TG	1,00	0,99 – 1,00	NS

*OR* – Odds ratio; *IC* – intervalo de confiança; HAS – hipertensão arterial; IECA - inibidor da enzima de conversora da angiotensina; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; TG – triglicerídeos.

#### ***4.2 Associação do polimorfismo no gene GCLC com o desenvolvimento de complicações crônicas***

A distribuição dos genótipos na população estudada foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência dos genótipos do polimorfismo -129C/T do gene *GCLC* entre a população diabética e a população controle não diabética (Tabela 15). Como a frequência do genótipo TT foi muito baixa, foi avaliado juntamente com o genótipo CT.

As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo1 de acordo com os genótipos do polimorfismo -129C/T do gene *GCLC* estão demonstradas na Tabela 16. A dislipidemia tratada foi significativamente mais frequente no grupo de pacientes com pelo menos um alelo T, bem como a presença de ND (incipiente a avançada), ND avançada e DRC.

Após análise de regressão logística, com ajuste dos genótipos CT + TT para dislipidemia tratada e cada uma das complicações separadamente, não houve associação da dislipidemia tratada com a presença de pelo menos um alelo T. As associações de cada complicação para presença de pelo menos um alelo T foram semelhantes àquelas obtidas após a análise da presença de pelo menos um alelo T como variável independente para essas complicações (demonstradas adiante).

**Tabela 15 - Frequência dos genótipos do polimorfismo -129 C/T do gene *GCLC* em pacientes diabéticos tipo 1 e em indivíduos controle não diabéticos**

<i>Genótipos</i>	<b>Diabéticos tipo 1 n = 293</b>	<b>Controles não diabéticos n = 141</b>
<i>GCLC/TT</i> , n (%)	4 (1,3)	0 (0)
<i>GCLC/CT</i> , n (%)	40 (13,7)	25 (17,7)
<i>GCLC/CC</i> , n (%)	249 (85,0)	116 (82,3)

*p* = NS

**Tabela 16 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo1 de acordo com os genótipos do polimorfismo -129C/T no gene *GCLC***

Variáveis	Portadores do genótipo CC n = 249	Portadores dos genótipos CT + TT n = 44	Valor de <i>p</i>
Gênero (M/F)	120/129	16/28	NS
Raça (caucasóide/negróide)	222/22/5	40/1/3	NS
Idade, anos, med (IIQ)	35,0 (27,1 – 44,3)	32,4 (26,7 – 40,3)	NS
Idade ao diagnóstico, anos, med (IIQ)	13,0 (7,0 – 20,0)	11,0 (8,0 – 16,0)	NS
Tempo de diabetes, anos, med (IIQ)	21,8 (18,0 – 26,0)	21,0 (16,6 – 25,7)	NS
Tabagismo, n (%)	21 (8,4)	5 (11,4)	NS
HAS tratada, n (%)	80 (32,1)	13 (29,5)	NS
Dislipidemia tratada, n (%)	35 (14,6)	12 (27,3)	0,034
ND avançada, n (%)	87 (34,9)	25 (56,8)	0,02
ND avançada, n (%)	129 (51,8)	33 (75,0)	0,021
DRC estágios 3 a 5, n (%)	64 (25,7)	21 (47,7)	0,009
RPD, n (%)	105 (43,9)	19 (43,2)	NS
Uso de IECA, n (%)	67 (26,9)	17 (38,6)	NS
Uso de BRA, n (%)	16 (6,4)	5 (11,4)	NS
IMC, kg/m <sup>2</sup>	22,4 (20,8 – 25,0)	23,0 (21,4 – 27,4)	NS
PAS, mmHg, med (IIQ)	120,0 (110,0 – 130,0)	121,0 (110 – 137,2)	NS
PAD, mmHg, med (IIQ)	80,0 (70,0 – 81,2)	80,0 (70,0 – 81,5)	NS
HbA <sub>1c</sub> , %, med (IIQ)	8,7 (8,0 – 9,9)	9,1 (8,0 – 10,6)	NS
COL total, mg/dL, med (IIQ)	175,0 (149,5 – 203,5)	179,5 (161,2 – 212,7)	NS
HDL-c, mg/dL, med (IIQ)	57,0 (47,0 – 68,0)	55,0 (44,0 – 70,0)	NS
LDL-c, mg/dL, med (IIQ)	95,0 (78,0 – 120,0)	96,0 (78,7 – 122,5)	NS
TG, mg/dL, med (IIQ)	83,5 (59,0 – 122,0)	91,0 (64,0 – 114,0)	NS

Os resultados estão expressos em mediana (med) e intervalo interquartil (IIQ). Foram utilizados os testes de  $\chi^2$  de Pearson para variáveis categóricas e de Mann-Whitney para variáveis contínuas; ND – nefropatia diabética; HAS – hipertensão arterial sistêmica; IECA – inibidor da enzima de conversora da angiotensina; BRA – bloqueador do receptor da angiotensina II; IMC – índice de massa corpórea; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; Hb – hemoglobina; COL – colesterol total; HDL-c – lipoproteína de alta densidade do colesterol; LDL-c – lipoproteína de baixa densidade do colesterol; TG – triglicerídeos. DRC – doença renal crônica; RDP – retinopatia diabética proliferativa.

#### **4.2.1 Complicações renais**

##### **4.2.1.1 Nefropatia diabética avançada e polimorfismo no gene GCLC**

A presença de pelo menos um alelo T foi mais freqüente no grupo com ND avançada que no grupo sem ND avançada (22,3% *versus* 11,4%), o que resultou em *OR* de 2,22 (IC 95% = 1,12 – 4,41  $p = 0,02$ ). O poder da amostra foi de 62,2% (Tabela 17).

Após a análise de regressão logística binária, a presença de pelo menos um alelo T conferiu risco independente para a presença de ND avançada, com *OR* de 2,82 (IC 95% = 1,13 -7,05;  $p = 0,026$ ) após ajuste para a idade atual, tempo de DM, freqüência de HAS e dislipidemia tratadas, medida de IMC, PAS e PAD e concentrações de TG(Tabela 18).

**Tabela 17 - Frequência dos genótipos CT + TT do polimorfismo -129C/T do gene *GCLC* de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND) avançada**

Variável	Sem ND avançada N =140	Com ND avançada n = 112	Valor de <i>p</i>
<i>GCLC</i> (CT + TT) , n (%)	16 (11,4)	25 (22,3)	0,02

OR: 2,22; IC 95%: 1,12 – 4,41, *p*: 0,02. Poder da amostra (IC 95%): 62,2%.

**Tabela 18 - Regressão logística binária para nefropatia diabética avançada**

Variáveis	OR	IC (95%)	Valor de <i>p</i>
Idade atual	1,01	0,97 – 1,06	NS
Tempo de diabetes	1,06	1,00 – 1,13	0,037
HAS tratada	2,58	1,17 – 5,56	0,018
Dislipidemia tratada	2,54	1,09 – 5,93	0,031
IMC	0,77	0,68 -0,87	<0,001
PAS	1,01	0,98 – 1,05	NS
PAD	1,02	0,97 – 1,07	NS
TG	1,00	0,99 – 1,00	NS
<b><i>GCLC</i> (CT + TT)</b>	<b>2,82</b>	<b>1,13 – 7,05</b>	<b>0,026</b>

OR – odds ratio; IC – intervalo de confiança; HAS – hipertensão arterial sistêmica; IMC – índice de massa corpórea, PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; TG – triglicerídeos.

#### 4.2.1.2 *Nefropatia diabética e polimorfismo no gene GCLC*

A presença de pelo menos um alelo T foi mais freqüente no grupo com ND (incipiente a avançada) que no grupo sem ND (20,4% *versus* 8,2%), o que resultou em *OR* de 2,7 (IC 95% = 1,14 – 7,15;  $p = 0,021$ ). O poder da amostra foi de 66,2% (Tabela 19).

Após a análise de regressão logística binária, a presença de pelo menos um alelo T conferiu risco independente para a presença de ND, com *OR* de 3,64 (IC 95% = 1,27 – 10,36;  $p = 0,016$ ) após ajuste para a idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de DM, freqüência de HAS e dislipidemia tratadas, medidas de PAS e PAD e concentrações de TG (Tabela 20).

**Tabela 19 - Frequência dos genótipos CT + TT do polimorfismo -129C/T do gene *GCLC* de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND) incipiente a avançada**

Variável	Sem ND n =73	Com ND incipiente a avançada n = 162
<i>GCLC</i> (CT + TT), n (%)	6 (8,2)	33 (20,4)

OR: 2,7; IC: 1,14 -7,15,  $p = 0,021$ . Poder da amostra (IC 95%): 66,2%.

**Tabela 20 - Regressão logística binária para nefropatia diabética incipiente a avançada**

Variáveis	OR	IC (95%)	Valor de $p$
Idade atual	0,95	0,83 – 1,09	NS
Idade de diagnóstico	1,07	0,93 – 1,23	NS
Tempo de diabetes	1,10	0,75, – 1,27	NS
HAS tratada	1,30	0,58 – 2,94	NS
Dislipidemia tratada	2,71	1,21 – 7,32	0,048
PAS	1,01	0,98 – 1,04	NS
PAD	1,01	0,96 – 1,06	NS
TG	1,00	0,99 – 1,00	NS
<b><i>GCLC</i> (CT + TT)</b>	<b>3,64</b>	<b>1,27 – 10,36</b>	<b>0,016</b>

OR – odds ratio; IC – intervalo de confiança; HAS – hipertensão arterial sistêmica; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; TG – triglicérides.



#### 4.2.1.3 *Doença renal crônica e polimorfismo no gene GCLC*

A presença de pelo menos um alelo T foi mais frequente no grupo com DRC estágios 3 a 5 que no grupo sem DRC a DRC estágio 2 (24,7% *versus* 11,9%), o que resultou em um *OR* de 2,53 (IC 95% = 1,33 – 4,8;  $p = 0,004$ ). O poder da amostra foi de 72,6% (Tabela 21).

Após a análise de regressão logística binária, a presença de pelo menos um alelo T conferiu risco independente para a presença de DRC estágios 3 a 5, com *OR* de 5,74 (IC 95% = 2,17 – 15,1;  $p < 0,001$ ) após ajuste para a frequência de pacientes do gênero feminino, idade atual, tempo de DM, frequência de HAS tratada, medidas de IMC e PAS e concentrações de TG (Tabela 22).

**Tabela 21 - Frequência dos genótipos CT + TT do polimorfismo -129C/T do gene *GCLC* de acordo com o estágio da doença renal crônica**

Variável	DM1 s/ DRC a DRC estágio 2 n = 168	DM1 com DRC estágios 3 a 5 n = 85
<i>GCLC</i> (CT+TT), n (%)	22 (11,9)	21 (24,7)

OR: 2,53; IC 1,33 - 4,80,  $p = 0,004$ . Poder da amostra (IC 95%): 72,6%.

**Tabela 22 - Análise de regressão logística binária para doença renal crônica estágios 3 a 5**

Variáveis	OR	IC (95%)	Valor de $p$
Gênero (F)	2,90	1,29 – 6,54	0,010
Idade atual	1,07	0,98 - 1,08	NS
Tempo de diabetes	1,08	1,01 – 1,15	0,017
HAS tratada	2,91	1,25 – 6,76	0,013
IMC	0,74	0,64 – 0,85	<0,001
PAS	1,02	0,99 -1,04	NS
TG	1,00	0,99 – 1,01	NS
<b><i>GCLC</i> (CT + TT)</b>	<b>5,74</b>	<b>2,17 -15,16</b>	<b>&lt;0,001</b>

OR – Odds ratio; IC- intervalo de confiança; F- feminino; HAS – hipertensão arterial; IMC – índice de massa corpórea; PAS – pressão arterial sistólica; TG – triglicerídeos.

#### 4.2.2 Retinopatia diabética e polimorfismo no gene *GCLC*

Não houve associação entre a presença de pelo menos um alelo T e a presença de RDP na população estudada (Tabela 23).

**Tabela 23 - Frequência dos genótipos CT + TT do polimorfismo -129C/T do gene *GCLC* de acordo com a presença ou ausência de retinopatia diabética proliferativa (RDP)**

Variável	Sem RDP n = 160	Com RDP n = 125
<i>GCLC</i> (CT +TT), n (%)	25 (15,6)	19 (15,2)

*p* = NS

### 4.3 Associação do polimorfismo no gene *GPXI* com o desenvolvimento de complicações crônicas

A distribuição dos genótipos foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada. Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência dos alelos com quatro, cinco ou seis repetições do trinucleotídeo CGC no exon 1 do gene *GPXI* ou na frequência dos genótipos entre a população diabética e a população-controle não diabética (Tabela 24).

**Tabela 24 - Frequência dos alelos e genótipos do polimorfismo com repetições GCG no gene *GPXI* em diabéticos tipo 1 e em controles não diabéticos**

<b>Alelos e genótipos</b>	<b>Diabéticos tipo 1 n = 278</b>	<b>Controles não diabéticos n = 141</b>
Alelo com 4 repetições, n (%)	248 (89,2)	133 (94,3)
Alelo com 5 repetições, n (%)	104 (30,4)	49 (34,7)
Alelo com 6 repetições, n (%)	125 (44,9)	57 (40,4)
Homozigoto para 4 repetições, n (%)	60 (21,6)	39 (27,6)
Homozigoto para 5 repetições, n (%)	10 (3,6)	0
Homozigoto para 6 repetições, n (%)	14 (5,0)	4 (2,8)

$p = \text{NS}$

#### ***4.3.1 Complicações diabéticas e polimorfismo no gene GPXI***

Para estas avaliações, foram considerados 140 pacientes com DM. Não houve diferenças estatisticamente significantes na frequência dos alelos com quatro, cinco ou seis repetições do trinucleotídeo GCG no exon 1 do gene *GPXI* entre os grupos com e sem cada uma das complicações crônicas estudadas (Tabelas 25 a 28).

**Tabela 25 - Frequência dos genótipos com quatro, cinco e seis repetições do polimorfismo GCG no gene *GPXI* de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND) avançada**

<b>Variáveis</b>	<b>Sem ND avançada n = 84</b>	<b>Com ND avançada n = 50</b>
Genótipos c/ 4 repetições <i>GCG</i> , n (%)	47 (88,1)	45 (90,0)
Genótipos c/ 5 repetições <i>GCG</i> , n (%)	29 (34,5)	17 (34,0)
Genótipos c/ 6 repetições <i>GCG</i> , n (%)	40 (47,6)	27 (54,0)

*p* = NS.

**Tabela 26 - Frequência dos genótipos com quatro, cinco e seis repetições do polimorfismo GCG no gene *GPXI* de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND)**

<b>Variáveis</b>	<b>Sem ND n = 31</b>	<b>Com ND incipiente a avançada n = 89</b>
Genótipos c/ 4 repetições de <i>GCG</i> , n (%)	28 (90,3)	80 (89,9)
Genótipos c/ 5 repetições de <i>GCG</i> , n (%)	12 (38,7)	32 (36,0)
Genótipos c/ 6 repetições de <i>GCG</i> , n (%)	15 (48,4)	36 (40,4)

*p* = NS.

**Tabela 27 - Frequência dos genótipos com quatro, cinco e seis repetições do polimorfismo GCG no gene *GPXI* de acordo com o estágio da doença renal crônica (DRC)**

<b>Variáveis</b>	<b>Sem DRC a DRC estágio 2 n = 91</b>	<b>Com DRC estágios 3 a 5 n= 46</b>
Genótipos c/ 4 repetições GCG, n (%)	82 (86,3)	42 (93,3)
Genótipos c/ 5 repetições GCG, n (%)	36 (37,9)	13 (28,9)
Genótipos c/ 6 repetições GCG, n (%)	47 (49,5)	24 (53,3)

*p* = NS.

**Tabela 28 - Frequência dos genótipos com quatro, cinco e seis repetições do polimorfismo GCG no gene *GPXI* de acordo com a presença ou ausência de retinopatia diabética proliferativa (RDP)**

<b>Variáveis</b>	<b>Sem RDP n = 77</b>	<b>Com RDP n = 61</b>
Genótipos c/ 4 repetições de GCG, n (%)	67 (87,0)	55 (90,2)
Genótipos c/ 5 repetições de GCG n (%)	31 (40,3)	18 (29,5)
Genótipos c/ 6 repetições de GCG n (%)	41 (53,2)	29 (47,5)

*p* = NS.

#### ***4.4 Associação do polimorfismo no gene GPX3 com o desenvolvimento de complicações crônicas***

A distribuição dos genótipos na população estudada foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência dos genótipos do polimorfismo -65 T/C no gene *GPX3* entre a população diabética e a população controle não diabética (Tabela 29). Como a frequência do genótipo CC foi muito baixa, o mesmo foi avaliado juntamente com o genótipo TC.

As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo 1 de acordo com os genótipos do polimorfismo -65 T/C no gene *GPX3* estão demonstradas na Tabela 30. As concentrações de COL total (187,0 *versus* 172,0;  $p = 0,027$ ) e de colesterol LDL (102,0 *versus* 91,0;  $p = 0,046$ ) foram significativamente maiores no grupo de pacientes com pelo menos um alelo C, bem como a frequência de ND avançada, DRC estágios 3 a 5 e RDP.

Após análise de regressão logística, com ajuste dos genótipos TC + CC para concentrações de COL total e colesterol LDL e cada uma das complicações separadamente, não houve associação dessas medidas bioquímicas com a presença de pelo menos um alelo C. As associações de cada complicação para presença de pelo menos um alelo C foram semelhantes à análise da presença de pelo menos um alelo C como variável independente para essas complicações (demonstradas adiante).



**Tabela 29 - Frequência dos genótipos do polimorfismo -65T/C no gene *GPX3* em pacientes diabéticos tipo 1 e em indivíduos-controle não diabéticos**

<b>Genótipos</b>	<b>Diabéticos tipo 1 (n = 298)</b>	<b>Controles não diabéticos (n = 119)</b>
<i>GPX3</i> /TT, n (%)	227 (76,2)	88 (73,9)
<i>GPX3</i> /TC, n (%)	71 (23,8)	28 (23,5)
<i>GPX3</i> /CC, n (%)	0	3(2,5)

*p* = NS.

**Tabela 30 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo 1 de acordo com os genótipos do polimorfismo -65T/C no gene *GPX3***

Variáveis	Genótipo TT n = 227	Genótipos TC + CC n = 71	Valor de p
Gênero (M/F)	104/123	32/39	NS
Raça (caucasóide/negróide)	125/18/4	62/5/4	NS
Idade, anos, med (IIQ)	34,0 (26,6 – 43,6)	35,0 (19,1 – 44,1)	NS
Idade ao diagnóstico, anos, med (IIQ)	11,0 (6,0 – 18,0)	13,5 (8,0 -24,4)	NS
Tempo de diabetes, anos, med (IIQ)	21,2 (18,0 26,0)	22,4 (5,8)	NS
Tabagismo, n (%)	20 (8,8)	6 (8,5)	NS
Nefropatia avançada, n (%)	77 (33,9)	35 (49,3)	0,004
Nefropatia incipiente a avançada, n (%)	120 (52,9)	43 (60,6)	NS
DRC estágios 3 a 5, n (%)	58 (25,6)	27 (38,0)	0,02
RPD, n (%)	89 (39,2)	38 (53,5)	0,023
HAS tratada, n (%)	69 (30,4)	25 (35,2)	NS
Dislipidemia tratada, n (%)	38 (16,7)	11 (15,5)	NS
Uso de IECA, n (%)	67 (29,5)	18 (25,4)	NS
Uso de BRA, n (%)	16 (6,7)	5 (7,0)	NS
IMC, kg/m <sup>2</sup> , med (IIQ)	22,8 (20,9 – 26,0)	23,0 (21,1– 24,6)	NS
PAS, mmHg, med (IIQ)	120,0 (110,0 – 130,0)	120,0 (110,0 – 140,0)	NS
PAD, mmHg, med (IIQ)	80,0 (70,0 – 80,0)	80,0 (70,0 – 90,0)	NS
HbA <sub>1C</sub> , %, med (IIQ)	8,8 (8,0 – 9,9)	8,9 (7,8 – 10,0)	NS
COL total, mg/dL, med (IIQ)	172,0 (149,0 – 20)	187,0 (162,0 – 206,0)	0,027
HDL-c, mg/dL, med (IIQ)	56,0 (46,5 – 68,0)	60,5 (49,0 – 77,2)	NS
LDL-c, mg/dL, med (IIQ)	91,0 (77,0 – 119,5)	102,0 (86,2 – 121,7)	0,046
TG, mg/dL, med (IIQ)	83,0 (59,0 – 122,0)	89,0 (59,0 – 118,0)	NS

Os resultados estão expressos em mediana (med) e intervalo interquartilico (IIQ). Foram utilizados os testes de  $\chi^2$  de Pearson para variáveis categóricas e de Mann-Whitney para variáveis contínuas; HAS – hipertensão arterial sistêmica; IECA – inibidor da enzima de conversora da angiotensina; BRA – bloqueador do receptor da angiotensina II; IMC – índice de massa corpórea; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; Hb – hemoglobina; COL – colesterol total; HDL-c – lipoproteína de alta densidade do colesterol; LDL-c – lipoproteína de baixa densidade do colesterol; TG – triglicerídeos. DRC – doença renal crônica; RDP – retinopatia diabética proliferativa.

#### **4.4.1 Complicações renais**

##### **4.4.1.1 Nefropatia diabética avançada e polimorfismo no gene GPX3**

A presença de pelo menos um alelo C do polimorfismo -65T/C do gene GPX3 foi mais freqüente no grupo com ND avançada que no grupo sem ND avançada (31,2% versus 16,0%), o que resultou em OR de 2,37 (IC 95% = 1,30 – 4,31; p = 0,004). O poder da amostra foi de 81,8% (Tabela 31). Após a análise de regressão logística binária, a presença de pelo menos um alelo C conferiu risco independente para a presença de ND avançada com OR de 2,62 (IC 95% = 1,19 -5,72, p = 0,022) após ajuste para a idade atual, tempo de DM, freqüência de HAS e de dislipidemia tratadas, medidas de IMC, PAS e PAD e concentrações de TG (Tabela 32).

**Tabela 31 - Frequência dos genótipos TC + CC do polimorfismo -65T/C no gene *GPX3* de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND) avançada**

Variável	Sem ND avançada n = 143	Com ND avançada n = 112
<i>GPX3</i> (TC + CC),n (%)	23 (16,0)	35 (31,2)

OR: 2,37; IC: 1,30 – 4,31;  $p = 0,004$ . Poder da amostra (IC 95%): 81,8%.

**Tabela 32 - Regressão logística binária para nefropatia diabética avançada**

Variáveis	OR	IC (95%)	Valor de $p$
Idade atual	1,01	0,97 – 1,05	NS
Tempo de diabetes	1,06	1,00 – 1,12	0,044
HAS tratada	2,62	1,19 – 5,76	0,016
Dislipidemia tratada	2,84	1,24 – 6,52	0,022
IMC	0,78	0,70 – 0,88	<0,001
PAS	1,02	0,98 – 1,05	NS
PAD	1,01	0,96 – 1,06	NS
TG	1,00	0,99 – 1,00	NS
<b><i>GPX3</i> (TC + CC)</b>	<b>2,62</b>	<b>1,19 – 5,72</b>	<b>0,022</b>

OR – odds ratio; IC – intervalo de confiança, HAS – hipertensão arterial sistêmica, IMC – índice de massa corpórea, PAS – pressão arterial sistólica, PAD – pressão arterial diastólica; TG – triglicerídeos.

#### 4.4.1.2 Nefropatia diabética e polimorfismo no *GPX3*

A presença de pelo menos um alelo C foi mais freqüente no grupo com ND (incipiente a avançada) em comparação ao grupo de pacientes sem ND (26,3% versus 19,2%), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 33).

**Tabela 33 - Freqüência dos genótipos TC + CC do polimorfismo -65T/C no gene *GPX3* de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND)**

Variáveis	Sem ND n = 73	Com ND incipiente a avançada n = 163
<i>GPX3</i> (TC + CC), n (%)	14 (19,2)	43 (26,3)

*p* = NS.

#### 4.4.1.3 Doença renal crônica e polimorfismo no gene *GPX3*

Na análise univariada, a presença de pelo menos um alelo C foi mais frequente no grupo com DRC estágios 3 a 5 em comparação ao grupo sem DRC a DRC estágio 2 (31,8% versus 18,7%), o que resultou em *OR* de 2,02 (IC 95% = 1,11 – 3,67; *p* = 0,02). O poder da amostra foi de 64,3% (Tabela 34). Essa associação não permaneceu significativa após a análise multivariada.

**Tabela 34 - Frequência dos genótipos TC + CC do polimorfismo -65T/C do gene *GPX3* de acordo com o estágio da doença renal crônica (DRC)**

Variável	Sem DRC a DRC estágio 2 n= 171	Com DRC estágios 3 a 5 n= 85
<i>GPX3</i> (TC+CC), n (%)	32 (18,7)	27 (31,8)

*OR*: 2,02; IC 95%: 1,11 – 3,67; *p* = 0,02. Poder da amostra (IC 95%): 64,3%.

#### 4.4.2 Retinopatia diabética proliferativa e polimorfismo no gene *GPX3*

Na análise univariada, a presença de pelo menos um alelo C foi mais frequente no grupo com RDP que no grupo sem RDP (29,9% versus 18,5%), o que resultou em *OR* de 1,8 (IC 95% = 1,08 – 3,25;  $p = 0,023$ ). O poder da amostra foi de 62% (Tabela 35). Essa associação não permaneceu significativa após a análise multivariada.

**Tabela 35 - Frequência dos genótipos TC + CC do polimorfismo -65T/C no gene *GPX3* de acordo com a presença ou ausência de retinopatia diabética proliferativa (RDP)**

Variável	Sem RDP n= 162	Com RDP n= 127
<i>GPX3</i> (TC + CC), n (%)	30 (18,5)	38 (29,9)

*OR*: 1,8; IC 95%: 1,08 – 3,25;  $p = 0,023$ . Poder da amostra (IC 95%): 62%.

#### **4.5 Associação entre os haplótipos determinados pelas variantes alélicas nos genes *GCLC* e *GPX3* e as complicações crônicas**

A associação dos haplótipos determinados pela combinação dos possíveis genótipos dos genes *GCLC* e *GPX3* com a presença das complicações está representada na Tabela 36. As duas primeiras letras do haplótipos correspondem ao genótipo do gene *GCLC* e as duas últimas letras correspondem aos genótipos do gene *GPX3*. O haplótipo CC\_TT, formado pelos alelos selvagens dos dois genes, foi negativamente associado com ND avançada ( $OR = 0,3$ ;  $IC\ 95\% = 0,22 - 0,6$ ;  $p < 0,001$ ), ND ( $OR = 0,46$ ;  $IC\ 95\% = 0,25 - 0,85$ ;  $p = 0,012$ ) e DRC ( $OR = 0,35$ ;  $IC = 0,2 - 0,61$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabela 36).

A associação negativa permaneceu mesmo após correção por análise multivariada para as variáveis significativamente diferentes na análise univariada para ND avançada ( $OR = 0,32$ ,  $IC\ 95\% = 0,15 - 0,66$ ;  $p = 0,002$ ) e DRC ( $OR = 0,25$ ;  $IC\ 95\% = 0,11 - 0,55$ ;  $p = 0,001$ ), mas não para a presença de ND. Já o haplótipo CC\_TC conferiu risco para a presença de ND avançada ( $OR = 2,0$ ;  $IC\ 95\% = 1,11 - 3,87$ ;  $p = 0,021$ ) e DRC ( $OR = 1,9$ ;  $IC\ 95\% = 1,05 - 3,66$ ;  $p = 0,031$ ), porém apenas na análise univariada. Não houve associação de qualquer haplótipo com RDP.



**Tabela 36 - Frequência dos haplótipos formados pelos alelos dos genes *GCLC* e *GPX3* de acordo com presença das complicações diabéticas**

<b>Haplótipos (<i>GLCL_GPX3</i>)</b>	<b>Sem ND avançada n = 140</b>	<b>Com ND avançada n = 112</b>	<b>Sem ND n = 73</b>	<b>Com ND n = 162</b>	<b>Sem DRC a DRC estágio 2 n =168</b>	<b>Com DRC estágio 3 a 5 n = 85</b>
TT_TT, n (%)	2 (1,4)	2 (1,8)	0	3 (1,9)	2 (1,2)	2 (2,4)
CT_TT, n (%)	12 (8,6)	18 (16,1)	5 (6,8)	24 (18,4)	14 (18,3)	16 (18,8)
CT_TC, n (%)	2 (1,4)	5 (4,5)	1 (1,4)	6 (3,7)	4 (2,4)	3 (3,5)
CC_TT, n (%)	103 (73,6)	57 (50,9)*	54 (74,0)	92 (56,8)§	120 (71,4)	40 (47,1)†
CC_TC, n (%)	21 (15,0)	30 (26,8)**	13 (17,8)	37 (22,8)	28 (16,7)	24 (24,2) ††

\*OR : 0,3; IC 95% : 0,22– 0,6;  $p < 0,001$ .

\*\* OR : 2,0; IC 95% : 1,11 – 3,87;  $p = 0,021$ .

§ OR: 0,46; IC 95% : 0,25– 0,85  $p = 0,012$ .

† OR : 0,35; IC 95% : 0,2 – 0,61;  $p < 0,001$ .

††OR : 1,9; IC 95% : 1,05 – 3,66;  $p = 0,031$ .

ND – nefropatia diabética, DRC – doença renal crônica

## **5 DISCUSSÃO**

As complicações diabéticas microvasculares são uma das principais causas de cegueira, doença renal terminal e neuropatias debilitantes (1). O estudo dos fatores genéticos de suscetibilidade a essas complicações é importante na identificação de indivíduos sob maior risco, para os quais o controle da glicemia e demais fatores de risco poderia ser intensificado. A identificação de fatores genéticos de suscetibilidade também pode elucidar novos mecanismos fisiopatológicos associados ao aparecimento das complicações e, até, contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

O estresse oxidativo foi implicado com fator unificador das vias de dano celular induzido pela hiperglicemia (38), e seu aumento já foi demonstrado em portadores de diabetes em vários estudos (49, 54, 89-96). Dentre os sistemas de defesa antioxidante, a glutathiona é considerada um importante antioxidante endógeno; no entanto, a associação entre polimorfismos em genes que codificam enzimas que participam desse sistema e complicações crônicas do diabetes foi pouco explorada na literatura (76-78).

No presente estudo, foram inicialmente avaliadas as características clínicas dos portadores de DM1 relativas à presença ou não de complicações renais e de RDP. Para o estudo da associação dos polimorfismos com as complicações renais, foram realizadas três formas de análise: considerando a presença ou não de ND, ND avançada e de DRC. Consideramos que a análise apenas da ND pudesse não ser a melhor forma de avaliar os dados, já que o grupo de diabéticos selecionado apresenta um controle glicêmico inadequado, um longo período de doença, representado por uma mediana de tempo igual ou superior a 20 anos de diabetes. Pacientes com essas

características, apresentando “somente” microalbuminúria, em vigência de condições tão propícias para o aparecimento de complicações crônicas, poderiam até ser considerados “protegidos” para o acometimento renal, razão pela qual optamos por também considerar a análise levando em conta o declínio do RFG.

O RFG considerado foi aquele estimado pela fórmula de Crockcroft Gault, que não representa o RFG real com a mesma fidelidade de outros métodos que utilizam marcadores exógenos, por exemplo, o *clearance* de inulina, iotalamato ou iohexol, que são complexos, caros e pouco disponíveis na prática clínica (97). Uma crítica à utilização de fórmulas para o cálculo do RFG em pacientes diabéticos é a não detecção da fase precoce da ND, caracterizada por hiperfiltração renal mesmo na ausência de microalbuminúria. Por essa razão, RFG menores que 90 mL/min já podem representar perda da função renal (98).

Ibrahim e colaboradores avaliaram 1.286 pacientes com DM tipo 1 do estudo DCCT, comparando o RFGe pelas fórmulas de Crockcroft Gault e MDRD (derivada do estudo *The Modification of Diet in Renal Disease* (98)) com o RFG medido por *clearance* de iotalamato e verificaram que a fórmula de Crockcroft Gault foi mais acurada quando o RFG medido estava entre 60 a 120 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (99).

Apesar das críticas, o RFGe complementado com marcadores de dano renal, especialmente a albuminúria, permanecem sendo as ferramentas acessíveis para a avaliação do comprometimento renal no acompanhamento dos pacientes diabéticos. Considera-se que pacientes com marcadores de dano renal, como proteinúria ou anormalidades em estudos de imagem ou em biópsias renais tenham doença mesmo com RFGe maior que 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (97).

Nas recomendações do *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*<sup>TM</sup> (KDOQI) para DM e doença renal crônica, considera-se que pacientes com DRC em estágios 1 e 2 e microalbuminúria negativa sejam vistos como pacientes de risco para o desenvolvimento de ND, pois esses pacientes já teriam passado da fase inicial de hiperfiltração. Para os pacientes com RFGe menor ou igual a 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> sem microalbuminúria, o KDOQI considera pouco provável o diagnóstico de ND e recomenda a investigação de outras causas, tais como doenças sistêmicas, nefropatia hipertensiva e estenose de artéria renal. Apesar dessas recomendações, o KDOQI admite a existência de pacientes diabéticos normoalbuminúricos com redução do RFG que, à biópsia, apresentam evidência de glomerulopatia diabética (98).

A questão da ausência da microalbuminúria na doença renal secundária ao DM permanece a ser melhor investigada. Um estudo derivado do *The Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (EDIC) demonstrou que um número significativo de pacientes desenvolve insuficiência renal sem a presença de microalbuminúria. A proporção de pacientes com DM 1 que tinham RFGe < 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup> e EAU normal (< 30 mg/24h) foi de 29% aos cinco a seis anos de estudo. Aos nove a 10 anos de estudo, 55 pacientes tinham RFG < 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup>, com 24 pacientes (44%) apresentando EAU normal, 10 pacientes (18%) apresentando microalbuminúria (30 a 300 mg/24h) e 21 pacientes (38%) apresentando albuminúria clínica (>300 mg/24h) (100). Em outro estudo, Tolonen e colaboradores avaliaram 1.248 pacientes com DM 1 e entre os pacientes com EAU normal, apenas 2,3% tinham RFG < 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup>, 32,4% tinham RFG entre 60 e 90 mL/min/1,73m<sup>2</sup> e 63,7% função renal normal (101). Na casuística aqui estudada, 15 pacientes com microalbuminúria negativa apresentavam RFGe menor que 60

mL/min/1,73m<sup>2</sup> e dois destes apresentavam RFG menor que 30 mL/min/1,73m<sup>2</sup>. Nenhum desses pacientes foi submetido à biópsia renal para investigação de outras doenças.

Na caracterização dos pacientes em relação à presença ou ausência das complicações renais, fatores de risco clássicos como a maior duração do DM, a presença de HAS e de dislipidemia e maiores níveis pressóricos foram associados à presença delas nas análises univariadas. As maiores frequências de HAS e de dislipidemia tratadas foram os fatores de risco clássicos que conferiram risco para a presença de ND avançada após a análise multivariada, enquanto o maior valor do IMC teve um papel protetor. Quando considerada a presença ou ausência de ND, a dislipidemia tratada foi o único fator que conferiu risco significativo após a análise multivariada. A ausência de associação de ND com outros fatores de risco conhecidos pode ter sido influenciada pelo menor tamanho da amostra de pacientes sem ND, pois foram excluídos dessa análise pacientes que faziam uso de IECA ou BRA para que não se classificasse erroneamente pacientes já portadores de ND como não portadores, uma vez que essas drogas sabidamente reduzem a microalbuminúria.

A maior frequência de HAS e o gênero feminino conferiram risco significativo para o desenvolvimento de DRC estágios 3 a 5 na análise multivariada, enquanto o maior IMC teve um papel protetor. Na literatura, há descrição de maior desenvolvimento de DRC em portadores de DM tipo 1 do gênero masculino (102). Zhang e colaboradores observaram que mulheres portadoras de DM tipo 1 com controle glicêmico inadequado são mais protegidas em relação ao desenvolvimento de ND (103). No presente estudo, não foi avaliada a relação entre complicações renais e mortalidade ao longo do tempo. É possível que uma mortalidade mais

precoce de pacientes do gênero masculino possa explicar a menor frequência de DRC avançada nos homens em relação ao gênero feminino. Outro dado que não foi avaliado nesse estudo e que poderia contribuir para a maior frequência de DRC avançada em pacientes do gênero feminino seria o número de gestações que essas pacientes tiveram ao longo da vida.

O IMC foi significativamente menor no grupo classificado como portador de ND avançada e também DRC estágios 3 a 5. Na população geral, valores de IMC menores que  $18,5 \text{ kg/m}^2$  como também maiores que  $25 \text{ kg/m}^2$  já foram implicados como fatores de risco para desenvolvimento de DRC em 15 a 35 anos, em um estudo de coorte na população americana de Framingham (104). A associação da obesidade com o desenvolvimento de DRC; no entanto, desapareceu após ajuste para os fatores de risco cardiovascular, indicando que não é a obesidade *per se* que está relacionada ao desenvolvimento da DRC, mas os fatores de risco cardiovasculares (105). A variação do IMC, e não apenas o seu valor absoluto, foi descrita como inversamente relacionada com o desenvolvimento de DRC na população japonesa (106).

Entre pacientes com diabetes tipo 1, há evidências de aumento do risco de ND com menor IMC (107). É sabido que o estado nutricional é melhor em pacientes diabéticos que não estão em diálise e que há deterioração do estado nutricional quando do início da diálise. Um maior IMC inicial já foi associado a uma menor taxa de declínio do RFG (108). Mais uma vez, a falta de acompanhamento dos pacientes ao longo do tempo não nos permite tirar conclusões em relação às variações do IMC nos pacientes diabéticos que desenvolveram ou não as complicações renais.

Para avaliação da RD, foram considerados os pacientes com e sem RDP. Optou-se por essa forma de classificação, pois o estadiamento da retinopatia

diabética por exame de fundoscopia, principalmente em pacientes com RD não proliferativa, é observador dependente. A classificação por um só médico oftalmologista seria ideal para minimizar a variação entre observadores, porém, o caráter multidisciplinar desse trabalho impossibilitou a avaliação por um único observador. Em relação à RDP, o único fator de risco que permaneceu associado após a análise multivariada foi a maior frequência de HAS, embora na análise dos grupos com e sem RDP, a idade atual e o tempo de DM tenham sido significativamente maiores na população portadora de RDP.

É possível que certa homogeneidade da população selecionada para esse estudo, devido aos critérios de inclusão escolhidos, explique a não-identificação de fatores de risco clínicos classicamente associados às complicações crônicas. Todos os pacientes sem complicações e a grande maioria dos pacientes com complicações tinham no mínimo 15 anos de doença para serem incluídos e também era um pré-requisito para a inclusão, especialmente nos pacientes sem complicações, um controle glicêmico progresso inadequado. Assim, como praticamente todos os pacientes apresentavam um mau controle metabólico, esse fator de risco clássico não poderia explicar as diferenças nas frequências das complicações. Essa preocupação com a exclusão de pacientes que apresentassem um bom controle glicêmico progresso no grupo sem complicações até gerou um viés de seleção, já que na análise comparativa das populações com e sem RDP e também com e sem ND, os grupos de pacientes sem cada uma dessas complicações apresentava valores de HbA<sub>1C</sub> significativamente maiores que os grupos de pacientes com cada uma das complicações. Por essa razão, os valores significativamente diferentes de HbA<sub>1C</sub> não foram incluídos nas análises de regressão multivariada.



As maiores frequências do uso de IECA e de BRA e da presença de RDP também não foram consideradas na análise multivariada quando eram significativamente diferentes entre os grupos com e sem complicações na análise univariada, pois estes representam mais marcadores de complicações do que propriamente fatores de risco para o desenvolvimento delas.

O gene *GCLC* foi selecionado para esse estudo por codificar a subunidade catalítica da enzima  $\gamma$ -CGS, limitante no processo de síntese da glutatona. O polimorfismo escolhido, -129 C/T, havia sido previamente descrito como funcional, já que a presença do alelo T está associada a uma menor atividade transcricional da região promotora do gene *GCLC*, tanto em condições basais quanto em presença de ROS (81). Esse polimorfismo havia sido estudado na população japonesa, na qual o alelo T foi associado com disfunção vasomotora coronariana e infarto do miocárdio (81), e na população italiana, onde o alelo T foi associado a infarto do miocárdio, ataque isquêmico transitório e acidente vascular cerebral (109). Recentemente, Bekris e colaboradores estudaram o polimorfismo -129 C/T em uma população sueca portadora de DM tipo 1, e observaram que pacientes com o genótipo -129 C/T apresentavam concentrações maiores do auto-anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD) em comparação aos diabéticos com o genótipo -129 C/C e sugeriram que esse polimorfismo influencie as concentrações de anti-GAD e, talvez, a idade na qual o DM tipo 1 é diagnosticado (110). No presente estudo, a frequência desse polimorfismo não foi diferente entre a população controle e a população de pacientes diabéticos tipo 1 e a comparação da idade ao diagnóstico de DM demonstrou que a mesma foi maior nos portadores do genótipo CC em relação aos

pacientes portadores dos genótipos CT + TT (13,0 *versus* 11,0 anos); no entanto, essa diferença não alcançou significância estatística.

O polimorfismo -129C/T nunca havia sido associado a qualquer das complicações crônicas do DM. Assim, nossa hipótese foi que os diabéticos portadores do alelo -129T poderiam ser mais susceptíveis ao desenvolvimento de complicações microvasculares por não conseguirem aumentar a expressão do gene *GCLC* na vigência de um estresse oxidativo, o que resultaria em menor produção intracelular de glutathione e conseqüente aumento da suscetibilidade das células expostas à hiperglicemia crônica à lesão induzida por ROS. De fato, a presença de pelo menos um alelo T aumentou em 5,74 vezes o risco para desenvolvimento de DRC estágios 3 a 5, em 3,64 vezes o risco para desenvolvimento de ND e em 2,82 vezes o risco para desenvolvimento de ND avançada. O aumento do risco conferido pelo alelo T para a complicação renal, independentemente da forma como ela tenha sido definida, foi encontrado nas análises multivariadas, após o ajuste para as variáveis que eram significativamente diferentes entre os grupos com e sem complicações. Em contrapartida, o polimorfismo -129 C/T não parece estar associado com o desenvolvimento de RDP.

A enzima glutathione peroxidase (GPX) catalisa hidróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos a água e seus correspondentes alcoóis, utilizando a glutathione reduzida como substrato (111). A isoforma citosólica da GPX, a GPX-1, é a mais abundante e ubíqua forma intracelular dessa enzima, que desempenha um importante papel na defesa celular antioxidante. O alelo com seis repetições do trinucleotídeo GCG no exon 1 do gene *GPX1* codifica seis resíduos de alanina na proteína e é

também conhecido por Ala<sup>6</sup>. Esse alelo foi relacionado à doença cardiovascular (112) na população inglesa.

O polimorfismo Pro198Leu localizado na região codificadora do gene *GPXI* foi relacionado a um maior risco de câncer de mama (113) e de pulmão (114). Em 2004, Hamanishi e colaboradores estudaram vários polimorfismos presentes no gene *GPXI* e sua relação com a espessura das camadas íntima e média, um marcador de risco para doença cardiovascular, nas artérias carótidas em pacientes diabéticos tipo 2. Os alelos -602G, 2T, Ala<sup>6</sup> e 198Leu estavam em forte desequilíbrio de ligação entre si. O estudo funcional *in vitro* desses polimorfismos demonstrou que a combinação dos alelos 198Leu e Ala<sup>6</sup> promove uma redução de 40% na atividade da enzima (111). O polimorfismo Pro198Leu também foi estudado em relação à calcificação de artérias coronárias em diabéticos tipo 2 japoneses (115). Os autores observaram maior escore de cálcio (avaliado por tomografia computadorizada *multi-slice*) naqueles pacientes diabéticos tipo 2 heterozigotos ( $744 \pm 1.291$  versus  $245 \pm 399$ ,  $p = 0,006$ ) em relação aos homozigotos Pro198Pro e concluíram que a presença do polimorfismo em heterozigose representa um fator de suscetibilidade genética para aterosclerose coronariana nessa população.

No presente estudo, a frequência do alelo Ala<sup>6</sup> no gene *GPXI* não se associou a nenhuma das complicações microvasculares diabéticas. Os primeiros resultados da análise desse polimorfismo em nossa população indicaram uma maior frequência do alelo com cinco repetições GCG na população de pacientes com DM tipo 1 em relação à população controle. Por essa razão, a amostragem foi ampliada com a inclusão de quase todos os pacientes diabéticos tipo 1 de nosso banco, independentemente dos critérios de inclusão para o estudo das complicações

crônicas. Com o aumento da casuística, não se observaram diferenças significantes nas frequências de nenhum dos alelos entre o grupo diabético e o não diabético. Diferentemente dos polimorfismos nos genes *GCLC* e *GPX3*, nenhuma diferença na frequência dos alelos do gene *GPX1* entre os grupos de pacientes diabéticos com e sem complicações foi observada na análise preliminar, realizada nos primeiros 140 pacientes incluídos, razão pela qual a genotipagem desse gene não foi realizada na casuística de 299 pacientes.

A GPX-3, também chamada de glutathione peroxidase plasmática, é uma importante enzima antioxidante do plasma que neutraliza ROS provenientes do metabolismo normal e de insultos oxidativos, participando, assim, da manutenção dos efeitos vasorelaxantes e antitrombóticos do NO na vasculatura (116). Freedman e colaboradores (117) demonstraram que a deficiência da GPX-3 diminui o NO biodisponível, levando à hiperreatividade plaquetária e a um maior risco de trombose. A deficiência dessa enzima também já foi associada com doença coronariana (118) (119, 120) e acidente arterial isquêmico familiar (85) (117).

Em 2004, Bierl e colaboradores re-definiram a região promotora do gene *GPX3*, que possui sítios de ligação para vários fatores de transcrição e estudaram os determinantes da transcrição desse gene, evidenciando um aumento de 25 vezes em sua atividade transcricional em vigência de hipóxia (86). Até o início de 2007, três SNPs haviam sido descritos na região que compreende essa região promotora e o mais frequente deles, presente em 16% da população americana (87) foi selecionado para ser avaliado no presente estudo devido ao seu potencial de ser funcional, já que se encontra muito próximo a um elemento responsivo a metal (- 65 T/C).

Esse polimorfismo nunca havia sido estudado em nenhuma doença até que, no início de 2007, Voetsch e colaboradores estudaram oito polimorfismos na região promotora do *GPX3*, e verificaram que sete destes polimorfismos, inclusive o -65 T/C, estão em desequilíbrio de ligação e formam dois principais haplótipos, que correspondem a 95% dos oito haplótipos observados na população estudada. O haplótipo denominado “H2”, um dos dois mais frequentes e que contém o alelo C do polimorfismo -65 T/C, associou-se a um risco aumentado em 2,1 vezes para o desenvolvimento de acidente vascular cerebral quando comparado ao haplótipo “H1”, que contém o alelo T do polimorfismo -65 T/C. O estudo funcional do haplótipo H2 demonstrou diminuição da atividade transcricional quando comparado ao haplótipo H1, especialmente sob condições de hipóxia (121). No ano seguinte, os mesmos autores descreveram a associação do haplótipo H2 com risco aumentado em 10,7 vezes para a presença de trombose venosa cerebral (116).

No presente estudo, a presença de pelo menos um alelo C do polimorfismo -65 T/C do gene *GPX3* associou-se a um aumento do risco na análise univariada para ND avançada, DRC estágios 3 a 5 e RDP. Após a análise multivariada, entretanto, o alelo C conferiu risco aumentado em 2,62 vezes apenas para o desenvolvimento de ND avançada. É possível que o aumento da casuística mantenha o risco conferido pelo alelo C após a análise multivariada e isso deverá ser feito no futuro, pois esse foi o único polimorfismo estudado cuja frequência foi maior entre os pacientes com RDP em relação ao grupo de pacientes sem RDP, podendo ser importante na suscetibilidade tanto à ND quanto RD, ao contrário do polimorfismo -129 C/T que parece estar associado apenas ao desenvolvimento da ND.

A análise dos haplótipos determinados pela combinação dos possíveis genótipos dos genes *GCLC* e *GPX3* demonstrou que o haplótipo CC\_TT, no qual os alelos de risco dos respectivos genes não estão presentes, está associado à proteção para a ND avançada e DRC após a análise multivariada. Esses resultados sugerem que polimorfismos nesses genes relacionados à síntese e ação da glutatona participam da suscetibilidade ao desenvolvimento de complicações renais em pacientes diabéticos tipo 1.

Dentre as limitações desse estudo, destacamos o número relativamente pequeno de pacientes incluídos, resultado dos critérios de inclusão utilizados, que exigiam controle glicêmico insatisfatório por pelo menos 15 anos após o diagnóstico, para que a ausência de complicações não pudesse ser atribuída a um controle glicêmico adequado. Apesar disso, dois dos três polimorfismos estudados demonstraram associação com as complicações renais. A validação das associações aqui observadas em populações maiores é necessária para que se confirme a participação desses polimorfismos na suscetibilidade a complicações renais secundárias ao DM.

## **6 CONCLUSÕES**

Em conclusão, na população de pacientes diabéticos tipo 1 estudada observou-se que:

1. A presença de pelo menos um alelo T no polimorfismo funcional -129C/T no gene *GCLC* confere risco independente para doença renal crônica estágios 3 a 5, nefropatia diabética e nefropatia diabética avançada;

2. A presença de pelo menos um alelo C no polimorfismo funcional -65T/C no gene *GPX3* confere risco para nefropatia diabética avançada;

3. O haplótipo CC\_TT, formado pelos alelos selvagens dos genes *GCLC* e *GPX3* respectivamente, confere proteção contra o desenvolvimento de nefropatia diabética avançada e doença renal crônica estágios 3 a 5;

4. Genes que codificam enzimas que participam do metabolismo da glutatona estão envolvidos na suscetibilidade genética para o desenvolvimento de complicações renais.



## **7 REFERÊNCIAS**

1. The World Health Organization website. [cited 2008]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>.
2. Mulcahy RT, Wartman MA, Bailey HH, Gipp JJ. Constitutive and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence. *J Biol Chem* 1997 Mar 14;272(11):7445-54.
3. Oliveira JE, Milech A, Franco LJ. The prevalence of diabetes in Rio de Janeiro, Brazil. The Cooperative Group for the Study of Diabetes Prevalence in Rio De Janeiro. *Diabetes Care* 1996 Jun;19(6):663-6.
4. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993 Sep 30;329(14):977-86.
5. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998 Sep 12;352(9131):837-53.
6. Monti MC, Lonsdale JT, Montomoli C, Montross R, Schlag E, Greenberg DA. Familial Risk Factors for Microvascular Complications And Differential Male-Female Risk in a Large Cohort of American Families with Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 Sep 18.
7. National Kidney Foundation: K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39(suppl 1):S1- 266.
8. Perfil da Doença Renal Crônica O Desafio Brasileiro. 2007.
9. Chaturvedi N, Bandinelli S, Mangili R, Penno G, Rottiers RE, Fuller JH. Microalbuminuria in type 1 diabetes: rates, risk factors and glycemic threshold. *Kidney Int* 2001 Jul;60(1):219-27.
10. Hovind P, Tarnow L, Rossing P, Jensen BR, Graae M, Torp I, et al. Predictors for the development of microalbuminuria and macroalbuminuria in patients with type 1 diabetes: inception cohort study. *Bmj* 2004 May 8;328(7448):1105.
11. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int* 2003 Jan;63(1):225-32.
12. Andersen AR, Christiansen JS, Andersen JK, Kreiner S, Deckert T. Diabetic nephropathy in Type 1 (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study. *Diabetologia* 1983 Dec;25(6):496-501.
13. Young BA, Maynard C, Boyko EJ. Racial differences in diabetic nephropathy, cardiovascular disease, and mortality in a national population of veterans. *Diabetes Care* 2003 Aug;26(8):2392-9.
14. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *JAMA* 2003 Oct 22;290(16):2159-67.
15. Krolewski ASW, J.H. Natural history of diabetic nephropathy: How much can it be changed? . *Diabetes Rev* 1995;3(446-59).

16. Chase HP, Garg SK, Marshall G, Berg CL, Harris S, Jackson WE, et al. Cigarette smoking increases the risk of albuminuria among subjects with type I diabetes. *JAMA* 1991 Feb 6;265(5):614-7.
17. Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications (DCCT) Research Group. *Kidney Int* 1995 Jun;47(6):1703-20.
18. De Cosmo S, Bacci S, Piras GP, Cignarelli M, Placentino G, Margaglione M, et al. High prevalence of risk factors for cardiovascular disease in parents of IDDM patients with albuminuria. *Diabetologia* 1997 Oct;40(10):1191-6.
19. Fogarty DG, Krolewski AS. Genetic susceptibility and the role of hypertension in diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997 Mar;6(2):184-91.
20. Borch-Johnsen K, Norgaard K, Hommel E, Mathiesen ER, Jensen JS, Deckert T, et al. Is diabetic nephropathy an inherited complication? *Kidney Int* 1992 Apr;41(4):719-22.
21. Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH, Nelson RG, Knowler WC. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990 Jul;33(7):438-43.
22. Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1989 May 4;320(18):1161-5.
23. Quinn M, Angelico MC, Warram JH, Krolewski AS. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia* 1996 Aug;39(8):940-5.
24. Rajala U, Pajunpaa H, Koskela P, Keinanen-Kiukaanniemi S. High cardiovascular disease mortality in subjects with visual impairment caused by diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2000 Jul;23(7):957-61.
25. Orchard TJ, Dorman JS, Maser RE et al. Prevalence of complications in IDDM by sex and duration. Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study II. *Diabetes* 1990;39:1116-24.
26. Henricsson M, Nilsson A, Janzon L, Groop L. The effect of glycaemic control and the introduction of insulin therapy on retinopathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 1997 Feb;14(2):123-31.
27. Vogt L, Jutzi E, Michaelis D. Different frequencies of diabetic complications in insulin-treated patients with diabetes of comparable duration, in relation to age at onset of diabetes. *Soz Praventivmed* 1992;37(5):231-6.
28. Rossing P. The changing epidemiology of diabetic microangiopathy in type 1 diabetes. *Diabetologia* 2005 Aug;48(8):1439-44.
29. Santos KG, Tschiedel B, Schneider JR, Souto KE, Roisenberg I. Prevalence of retinopathy in Caucasian type 2 diabetic patients from the South of Brazil and relationship with clinical and metabolic factors. *Braz J Med Biol Res* 2005 Feb;38(2):221-5.
30. Pereira DS, Reis FAC, Waetge RTL, L. E. , Aihara T. The prevalence of diabetic retinopathy at the Pediatric Endocrinology Outpatient Clinic of the Santa Casa de São Paulo. *Arq Bras Oftalmol* 2004;67(1):111-4.

31. Effect of pregnancy on microvascular complications in the diabetes control and complications trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Diabetes Care* 2000 Aug;23(8):1084-91.
32. Aiello LP, Cahill MT, Wong JS. Systemic considerations in the management of diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2001 Nov;132(5):760-76.
33. Klein BE, Moss SE, Klein R, Surawicz TS. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XIII. Relationship of serum cholesterol to retinopathy and hard exudate. *Ophthalmology* 1991 Aug;98(8):1261-5.
34. Moss SE, Klein R, Klein BE. Ten-year incidence of visual loss in a diabetic population. *Ophthalmology* 1994 Jun;101(6):1061-70.
35. Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Diabetes* 1997 Nov;46(11):1829-39.
36. Leslie RD, Pyke DA. Diabetic retinopathy in identical twins. *Diabetes* 1982 Jan;31(1):19-21.
37. Guillausseau PJ, Tielmans D, Virally-Monod M, Assayag M. Diabetes: from phenotypes to genotypes. *Diabetes Metab* 1997 Mar;23 Suppl 2:14-21.
38. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001 Dec 13;414(6865):813-20.
39. Greene DA, Arezzo JC, Brown MB. Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy. Zenarestat Study Group. *Neurology* 1999 Aug 11;53(3):580-91.
40. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001 Dec 13;414(6865):813-20.
41. Ukkola O, Erkkila PH, Savolainen MJ, Kesaniemi YA. Lack of association between polymorphisms of catalase, copper-zinc superoxide dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Intern Med* 2001 May;249(5):451-9.
42. Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res* 1994 Apr 1;54(7 Suppl):1969s-75s.
43. Awasthi YC, Sharma R, Singhal SS. Human glutathione S-transferases. *Int J Biochem* 1994 Mar;26(3):295-308.
44. Protein home [database on the Internet] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>.
45. Piconi L, Quagliaro L, Ceriello A. Oxidative stress in diabetes. *Clin Chem Lab Med* 2003 Sep;41(9):1144-9.
46. Varvarovska J, Racek J, Stozicky F, Soucek J, Trefil L, Pomahacova R. Parameters of oxidative stress in children with Type 1 diabetes mellitus and their relatives. *J Diabetes Complications* 2003 Jan-Feb;17(1):7-10.
47. Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Crescentini A, Lizzio S, Russo A, et al. Meal-generated oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1998 Sep;21(9):1529-33.
48. Gopaul NK, Anggard EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF<sub>2</sub> alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1995 Jul 17;368(2):225-9.
49. Davi G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f<sub>2</sub>alpha and platelet activation in

- diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999 Jan 19;99(2):224-9.
50. Mori TA, Dunstan DW, Burke V, Croft KD, Rivera JH, Beilin LJ, et al. Effect of dietary fish and exercise training on urinary F2-isoprostane excretion in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism* 1999 Nov;48(11):1402-8.
  51. Mori TA, Puddey IB, Burke V, Croft KD, Dunstan DW, Rivera JH, et al. Effect of omega 3 fatty acids on oxidative stress in humans: GC-MS measurement of urinary F2-isoprostane excretion. *Redox Rep* 2000;5(1):45-6.
  52. Hoeldtke RD, Bryner KD, McNeill DR, Hobbs GR, Riggs JE, Warehime SS, et al. Nitrosative stress, uric Acid, and peripheral nerve function in early type 1 diabetes. *Diabetes* 2002 Sep;51(9):2817-25.
  53. Ceriello A, Quagliaro L, Catone B, Pascon R, Piazzola M, Bais B, et al. Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes Care* 2002 Aug;25(8):1439-43.
  54. Pereira EC, Ferderbar S, Bertolami MC, Faludi AA, Monte O, Xavier HT, et al. Biomarkers of oxidative stress and endothelial dysfunction in glucose intolerance and diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2008 Sep 3.
  55. Hodgkinson AD, Bartlett T, Oates PJ, Millward BA, Demaine AG. The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes* 2003 Mar;52(3):846-51.
  56. Ceriello A, Morocutti A, Mercuri F, Quagliaro L, Moro M, Damante G, et al. Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes* 2000 Dec;49(12):2170-7.
  57. Hernandez-Marco R, Codoner-Franch P, Pons Morales S, Del Castillo Villaescusa C, Boix Garcia L, Valls Belles V. Oxidant/antioxidant status and hyperfiltration in young patients with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Nephrol* 2008 Sep 10.
  58. Dong QY, Cui Y, Chen L, Song J, Sun L. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels in diabetic retinopathy patients. *Eur J Ophthalmol* 2008 Jan-Feb;18(1):94-8.
  59. Ali TK, Matragoon S, Pillai BA, Liou GI, El-Remessy AB. Peroxynitrite mediates retinal neurodegeneration by inhibiting nerve growth factor survival signaling in experimental and human diabetes. *Diabetes* 2008 Apr;57(4):889-98.
  60. Polychronakos C. Genetic testing in clinical endocrinology. *Hormones (Athens)* 2003 Oct-Dec;2(4):201-10.
  61. Salisbury BA, Pungliya M, Choi JY, Jiang R, Sun XJ, Stephens JC. SNP and haplotype variation in the human genome. *Mutat Res* 2003 May 15;526(1-2):53-61.
  62. Shastry BS. SNPs and haplotypes: genetic markers for disease and drug response (review). *Int J Mol Med* 2003 Mar;11(3):379-82.
  63. Correa-Giannella ML, Vieira SM. [Genetic susceptibility to microangiopathy development in Type 1 diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2008 Mar;52(2):375-86.
  64. Jacobsen PK. Preventing end stage renal disease in diabetic patients--genetic aspect (part I). *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2005 Mar;6(1):1-14.

65. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990 Oct;86(4):1343-6.
66. Hunley TE, Julian BA, Phillips JA, 3rd, Summar ML, Yoshida H, Horn RG, et al. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism: potential silencer motif and impact on progression in IgA nephropathy. *Kidney Int* 1996 Feb;49(2):571-7.
67. Boright AP, Paterson AD, Mirea L, Bull SB, Mowjoodi A, Scherer SW, et al. Genetic variation at the ACE gene is associated with persistent microalbuminuria and severe nephropathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC Genetics Study. *Diabetes* 2005 Apr;54(4):1238-44.
68. de Azevedo MJ, Dalmaz CA, Caramori ML, Pecis M, Esteves JF, Maia AL, et al. ACE and PC-1 gene polymorphisms in normoalbuminuric Type 1 diabetic patients: a 10-year prospective study. *J Diabetes Complications* 2002 Jul-Aug;16(4):255-62.
69. Cordovado SK, Zhao Y, Warram JH, Gong H, Anderson KL, Hendrix MM, et al. Nephropathy in type 1 diabetes is diminished in carriers of HLA-DRB1\*04: the genetics of kidneys in diabetes (GoKinD) study. *Diabetes* 2008 Feb;57(2):518-22.
70. Warpeha KM, Chakravarthy U. Molecular genetics of microvascular disease in diabetic retinopathy. *Eye* 2003 Apr;17(3):305-11.
71. Chistyakov DA, Savost'anov KV, Zotova EV, Nosikov VV. Polymorphisms in the Mn-SOD and EC-SOD genes and their relationship to diabetic neuropathy in type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genet* 2001;2:4.
72. Nomiyama T, Tanaka Y, Piao L, Nagasaka K, Sakai K, Ogihara T, et al. The polymorphism of manganese superoxide dismutase is associated with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *J Hum Genet* 2003;48(3):138-41.
73. Ukkola O, Erkkila PH, Savolainen MJ, Kesaniemi YA. Lack of association between polymorphisms of catalase, copper-zinc superoxide dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Intern Med* 2001 May;249(5):451-9.
74. Chistiakov DA, Turakulov RI, Shcherbacheva LN, Mamaeva GG, Galabolkin MI, Nosikov VV. [Analysis of polymorphism of the D11S2008 locus of the catalase gene in patients with hypertension and ischemic heart disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Muscovite population]. *Genetika* 2000 Mar;36(3):423-6.
75. Dincer Y, Akcay T, Alademir Z, Ilkova H. Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 2002 Oct;51(10):1360-2.
76. Yalin S, Hatungil R, Tamer L, Ates NA, Dogruer N, Yildirim H, et al. Glutathione S-transferase gene polymorphisms in Turkish patients with diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct* 2007 Sep-Oct;25(5):509-13.
77. Hossaini AM, Zamroni IM, Kashem RA, Khan ZFM. Polymorphism of glutathione S-transferases as genetic risk factors for the development of complications in type 2 diabetes mellitus. *jcrc* 2008;23 (3):444 - 8.

78. Doney AS, Lee S, Leese GP, Morris AD, Palmer CN. Increased cardiovascular morbidity and mortality in type 2 diabetes is associated with the glutathione S transferase theta-null genotype: a Go-DARTS study. *Circulation* 2005 Jun 7;111(22):2927-34.
79. Walsh AC, Feulner JA, Reilly A. Evidence for functionally significant polymorphism of human glutamate cysteine ligase catalytic subunit: association with glutathione levels and drug resistance in the National Cancer Institute tumor cell line panel. *Toxicol Sci*2001 Jun;61(2):218-23.
80. Nakamura S, Sugiyama S, Fujioka D, Kawabata K, Ogawa H, Kugiyama K. Polymorphism in glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene is associated with impairment of nitric oxide-mediated coronary vasomotor function. *Circulation*2003 Sep 23;108(12):1425-7.
81. Koide S, Kugiyama K, Sugiyama S, Nakamura S, Fukushima H, Honda O, et al. Association of polymorphism in glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene with coronary vasomotor dysfunction and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*2003 Feb 19;41(4):539-45.
82. Shen Q, Townes PL, Padden C, Newburger PE. An in-frame trinucleotide repeat in the coding region of the human cellular glutathione peroxidase (GPX1) gene: in vivo polymorphism and in vitro instability. *Genomics*1994 Sep 1;23(1):292-4.
83. Winter JP, Gong Y, Grant PJ, Wild CP. Glutathione peroxidase 1 genotype is associated with an increased risk of coronary artery disease. *Coron Artery Dis*2003 Apr;14(2):149-53.
84. Kote-Jarai Z, Durocher F, Edwards SM, Hamoudi R, Jackson RA, Ardern-Jones A, et al. Association between the GCG polymorphism of the selenium dependent GPX1 gene and the risk of young onset prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*2002;5(3):189-92.
85. Kenet G, Freedman J, Shenkman B, Regina E, Brok-Simoni F, Holzman F, et al. Plasma glutathione peroxidase deficiency and platelet insensitivity to nitric oxide in children with familial stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*1999 Aug;19(8):2017-23.
86. Bierl C, Voetsch B, Jin RC, Handy DE, Loscalzo J. Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression. *J Biol Chem* 2004 Jun 25;279(26):26839-45.
87. SNP Home Page [database on the Internet] [cited 2008]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>.
88. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*1976;16(1):31-41.
89. Piconi L, Quagliaro L, Ceriello A. Oxidative stress in diabetes. *Clin Chem Lab Med* 2003 Sep;41(9):1144-9.
90. Varvarovska J, Racek J, Stozicky F, Soucek J, Trefil L, Pomahacova R. Parameters of oxidative stress in children with Type 1 diabetes mellitus and their relatives. *J Diabetes Complications* 2003 Jan-Feb;17(1):7-10.
91. Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Crescentini A, Lizzio S, Russo A, et al. Meal-generated oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1998 Sep;21(9):1529-33.
92. Gopaul NK, Anggard EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with

- non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1995 Jul 17;368(2):225-9.
93. Mori TA, Dunstan DW, Burke V, Croft KD, Rivera JH, Beilin LJ, et al. Effect of dietary fish and exercise training on urinary F2-isoprostane excretion in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism* 1999 Nov;48(11):1402-8.
  94. Mori TA, Puddey IB, Burke V, Croft KD, Dunstan DW, Rivera JH, et al. Effect of omega 3 fatty acids on oxidative stress in humans: GC-MS measurement of urinary F2-isoprostane excretion. *Redox Rep* 2000;5(1):45-6.
  95. Hoeldtke RD, Bryner KD, McNeill DR, Hobbs GR, Riggs JE, Warehime SS, et al. Nitrosative stress, uric Acid, and peripheral nerve function in early type 1 diabetes. *Diabetes* 2002 Sep;51(9):2817-25.
  96. Ceriello A, Quagliaro L, Catone B, Pascon R, Piazzola M, Bais B, et al. Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes Care* 2002 Aug;25(8):1439-43.
  97. Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS. Assessing kidney function--measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med* 2006 Jun 8;354(23):2473-83.
  98. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis* 2007 Feb;49(2 Suppl 2):S12-154.
  99. Ibrahim H, Mondress M, Tello A, Fan Y, Koopmeiners J, Thomas W. An alternative formula to the Cockcroft-Gault and the modification of diet in renal diseases formulas in predicting GFR in individuals with type 1 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2005 Apr;16(4):1051-60.
  100. Molitch MER, B. Steffes, M. Cleary, P., editor. Renal insufficiency in the absence of albuminuria among adults with Type 1 diabetes in the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Study. ADA Annual Meeting; 2006; Las Vegas.
  101. Tolonen N, Forsblom C, Thorn L, Waden J, Rosengard-Barlund M, Saraheimo M, et al. Relationship between lipid profiles and kidney function in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2007 Nov 10.
  102. Mlynarski WM, Placha GP, Wolkow PP, Bochenski JP, Warram JH, Krolewski AS. Risk of diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with functional polymorphisms in RANTES receptor gene (CCR5): a sex-specific effect. *Diabetes* 2005 Nov;54(11):3331-5.
  103. Zhang L, Krzentowski G, Albert A, Lefebvre PJ. Factors predictive of nephropathy in DCCT Type 1 diabetic patients with good or poor metabolic control. *Diabet Med* 2003 Jul;20(7):580-5.
  104. Hsu CY, McCulloch CE, Iribarren C, Darbinian J, Go AS. Body mass index and risk for end-stage renal disease. *Ann Intern Med* 2006 Jan 3;144(1):21-8.
  105. Foster MC, Hwang SJ, Larson MG, Lichtman JH, Parikh NI, Vasani RS, et al. Overweight, obesity, and the development of stage 3 CKD: the Framingham Heart Study. *Am J Kidney Dis* 2008 Jul;52(1):39-48.
  106. Tokashiki K, Tozawa M, Iseki C, Kohagura K, Kinjo K, Takishita S, et al. Decreased body mass index as an independent risk factor for developing chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2008 Oct 7.



107. Kovesdy CP, Anderson JE, Kalantar-Zadeh K. Paradoxical association between body mass index and mortality in men with CKD not yet on dialysis. *Am J Kidney Dis* 2007 May;49(5):581-91.
108. Raffaitin C, Lasseur C, Chauveau P, Barthe N, Gin H, Combe C, et al. Nutritional status in patients with diabetes and chronic kidney disease: a prospective study. *Am J Clin Nutr* 2007 Jan;85(1):96-101.
109. Campolo J, Penco S, Bianchi E, Colombo L, Parolini M, Caruso R, et al. Glutamate-cysteine ligase polymorphism, hypertension, and male sex are associated with cardiovascular events. Biochemical and genetic characterization of Italian subpopulation. *Am Heart J* 2007 Dec;154(6):1123-9.
110. Bekris LM, Shephard C, Janer M, Graham J, McNeney B, Shin J, et al. Glutamate cysteine ligase catalytic subunit promoter polymorphisms and associations with type 1 diabetes age-at-onset and GAD65 autoantibody levels. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007 Apr;115(4):221-8.
111. Hamanishi T, Furuta H, Kato H, Doi A, Tamai M, Shimomura H, et al. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2004 Sep;53(9):2455-60.
112. Winter JP, Gong Y, Grant PJ, Wild CP. Glutathione peroxidase 1 genotype is associated with an increased risk of coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2003 Apr;14(2):149-53.
113. Hu YJ, Diamond AM. Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res* 2003 Jun 15;63(12):3347-51.
114. Ratnasinghe D, Tangrea JA, Andersen MR, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR, et al. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res* 2000 Nov 15;60(22):6381-3.
115. Nemoto M, Nishimura R, Sasaki T, Hiki Y, Miyashita Y, Nishioka M, et al. Genetic association of glutathione peroxidase-1 with coronary artery calcification in type 2 diabetes: a case control study with multi-slice computed tomography. *Cardiovasc Diabetol* 2007;6:23.
116. Voetsch B, Jin RC, Bierl C, Deus-Silva L, Camargo EC, Annichino-Bizacchi JM, et al. Role of promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene as a risk factor for cerebral venous thrombosis. *Stroke* 2008 Feb;39(2):303-7.
117. Freedman JE, Loscalzo J, Benoit SE, Valeri CR, Barnard MR, Michelson AD. Decreased platelet inhibition by nitric oxide in two brothers with a history of arterial thrombosis. *J Clin Invest* 1996 Feb 15;97(4):979-87.
118. Dogru-Abbasoglu S, Kanbagli O, Bulur H, Babalik E, Ozturk S, Aykac-Toker G, et al. Lipid peroxides and antioxidant status in serum of patients with angiographically defined coronary atherosclerosis. *Clin Biochem* 1999 Nov;32(8):671-2.
119. Porter M, Pearson DJ, Suarez-Mendez VJ, Blann AD. Plasma, platelet and erythrocyte glutathione peroxidases as risk factors in ischaemic heart disease in man. *Clin Sci (Lond)* 1992 Sep;83(3):343-5.

120. Muzakova V, Kandar R, Vojtisek P, Skalicky J, Cervinkova Z. Selective antioxidant enzymes during ischemia/reperfusion in myocardial infarction. *Physiol Res*2000;49(3):315-22.
121. Voetsch B, Jin RC, Bierl C, Benke KS, Kenet G, Simioni P, et al. Promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene: a novel risk factor for arterial ischemic stroke among young adults and children. *Stroke* 2007 Jan;38(1):41-9.