

MARIA BEATRIZ CAMARGO DE ALMEIDA MONTEIRO

Polimorfismos nos genes que codificam a glutathione peroxidase-4, a tioredoxina e a proteína de interação com a tioredoxina modulam a susceptibilidade à doença renal em portadores de diabetes mellitus tipo 1

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

São Paulo
2012

MARIA BEATRIZ CAMARGO DE ALMEIDA MONTEIRO

Polimorfismos nos genes que codificam a glutathione peroxidase-4, a tioredoxina e a proteína de interação com a tioredoxina modulam a susceptibilidade à doença renal em portadores de diabetes mellitus tipo 1

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Monteiro, Maria Beatriz Camargo de Almeida

Polimorfismos nos genes que codificam a glutathione peroxidase-4, a tioredoxina e a proteína de interação com a tioredoxina modulam a susceptibilidade à doença renal em portadores de diabetes mellitus tipo 1 / Maria Beatriz Camargo de Almeida Monteiro. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 1 2.Nefropatias diabéticas 3.Estresse oxidativo 4.Polimorfismo de um único nucleotídeo 5.Tiorredoxinas 6.Glutathione

USP/FM/DBD-009/12

Dedico este trabalho aos meus pais
Maria Cristina e Reinaldo e à família Monteiro,
que cultiva a paixão pela ciência há três gerações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Dra. Maria Lúcia Corrêa-Giannella, por ter me aceitado no laboratório quase sem me conhecer e ter tornado a experiência do mestrado uma fase simples e cheia de aprendizado. Obrigada pelos ensinamentos e pela dedicação ao meu trabalho.

A Suzana Vieira, por ter iniciado o banco de DNA de diabetes tipo 1.

A toda a equipe do LIM-25, em especial aos alunos e técnicos do grupo de diabetes.

Aos meus pais, a quem dedico este trabalho, por me apoiarem incondicionalmente, mesmo eu tendo escolhido carreiras nada convencionais.

Às minhas irmãs Maria Carolina, Maria Célia e Maria Cláudia, minhas amigas, minhas parceiras.

Ao meu marido Max, que se tornou oficialmente parte da família nesse meio tempo, e faz a minha vida muito mais feliz.

À amiga Melissa Zanquetta, pelas dicas, almoços e congressos (e também pelas compras, por que não?).

Às comadres Camila Canteiro e Gabriela Vasques, amigas pessoais e da endocrinologia.

A todos os amigos da USP que me acompanharam esse tempo todo: FFLCH, ICB, FM e IEE.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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 Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Hiperglicemia e complicações crônicas do diabetes	2
1.2	Hiperglicemia e Estresse oxidativo.....	3
1.2.1	O sistema glutathiona	7
1.2.2	O sistema glutarredoxina	12
1.2.3	O sistema tioredoxina	14
1.2.4	Transcetolase	15
1.3	Estudo de polimorfismos candidatos e a associação com as complicações diabéticas.....	17
2	OBJETIVOS.....	20
3	MÉTODOS.....	22
3.1	Escolha dos SNPs	23
3.2	Casuística e protocolo clínico.....	23
3.3	Definição das complicações renais	26
3.3.1	Nefropatia diabética franca	27
3.3.2	Ritmo de filtração glomerular estimado	27
3.3.3	Nefropatia diabética estabelecida	28
3.4	Extração do DNA	29
3.5	Reação em cadeia da polimerase em tempo real	30
3.6	Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição	32
3.7	Análise estatística	34

4	RESULTADOS.....	36
4.1	Análise das características clínicas dos pacientes	37
4.1.1	Análise de acordo com a presença ou ausência de ND estabelecida.....	37
4.1.2	Análise de acordo com o RFGe	38
4.1.3	Análise de acordo com a presença ou ausência de ND franca.....	40
4.2	Análise das associações entre os SNPs e a doença renal	42
4.2.1	Gene GPX4.....	42
4.2.2	Gene GSS – rs10427424	48
4.2.3	Gene GSR – rs2978668.....	48
4.2.4	Gene TXN – rs2301242	49
4.2.5	Gene TXNRD2 – rs3788319	52
4.2.6	Gene TXNIP – rs7211	53
4.2.7	Gene GLRX – rs6556885.....	59
4.2.8	Gene TKT	61
5	DISCUSSÃO.....	65
6	CONCLUSÕES.....	73
7	ANEXOS.....	75
8	REFERÊNCIAS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos propostos para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia. Adaptado de Browlee, 2001 ⁽¹⁾	5
Figura 2. Representação esquemática da via da glutathiona juntamente com a via da glutarredoxina. Grx – glutarredoxina; GSH – glutathiona reduzida; GSSG – glutathiona oxidada; GPX – glutathiona peroxidase; GSR – glutathiona redutase. Adaptado de Lillig, Berndt e Holmgren, 2008 ⁽⁴¹⁾	13
Figura 3. Representação esquemática da via da tiorredoxina. TXN1 tiorredoxina 1; TXN2 – tiorredoxina 2; TXNIP – proteína de interação com tiorredoxina. Adaptado de Maulik, N; Das, DK ⁽⁴⁷⁾	14
Figura 4: Desvio metabólico de frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato da via glicolítica para a via da pentose fosfato pela ativação da enzima transcetolase. Adaptado de Babaei-Jadidi R, et al., 2003 ⁽⁵³⁾	16
Figura 5. (A): Resultado de ensaio de genotipagem com presença de apenas um genótipo; (B): Resultado de ensaio de genotipagem com presença de dois ou mais genótipos	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos portadores de DM 1 de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND) estabelecida.....	38
Tabela 2. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos portadores de DM 1 de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado (RFGe).....	40
Tabela 3. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos portadores DM 1 de acordo com a ausência ou presença de nefropatia diabética (ND) franca	42
Tabela 4. Frequência dos genótipos do SNP +718C/T no gene <i>GPX4</i> em portadores de DM 1 e em indivíduos controle não diabéticos.	44
Tabela 5. Distribuição da frequência dos genótipos do SNP <i>GPX4</i> +718C/T no sexo masculino, de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND) estabelecida.....	45
Tabela 6. Análise de regressão logística com a nefropatia diabética estabelecida como variável dependente em pacientes portadores de DM1 do sexo masculino...	45
Tabela 7. Distribuição da frequência dos genótipos do SNP <i>GPX4</i> +718C/T no sexo masculino, de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND) franca.....	46
Tabela 8. Análise de regressão logística com a nefropatia diabética franca como variável dependente em portadores de DM1 do sexo masculino.....	47
Tabela 9. Análise das características clínicas e laboratoriais dos pacientes do sexo masculino de acordo com o genótipo do SNP <i>GPX4</i> +718C/T	48
Tabela 10. Frequência dos genótipos do SNP <i>TXN</i> -224 T/A em portadores de DM1 e em indivíduos controle não diabéticos.....	49

Tabela 11. Distribuição da frequência dos genótipos do SNP <i>TXN</i> -224 T/A no sexo feminino de acordo com a ausência ou presença de nefropatia diabética (ND) franca.....	50
Tabela 12. Análise de regressão logística com a nefropatia diabética franca como variável dependente em portadoras de DM1 do sexo feminino	51
Tabela 13. Análise das características clínicas e laboratoriais das pacientes do sexo feminino de acordo com o genótipo do SNP <i>TXN</i> -224 T/A.....	52
Tabela 14. Frequência dos genótipos do polimorfismo -192 G/A no gene <i>TXNRD2</i> em pacientes com DM 1 e em indivíduos controle não diabéticos.....	53
Tabela 15. Frequência dos genótipos do SNP +402 T/C do gene <i>TXNIP</i> em portadores de DM1 e em indivíduos controle não diabéticos	54
Tabela 16. Distribuição da frequência dos genótipos do SNP <i>TXNIP</i> +402 T/C no sexo masculino de acordo com o RFG _e ≥ ou < que 60 mL/min/1,73 m ²	55
Tabela 17. Análise de regressão logística com RFG _e ≥ ou < que 60 mL/min/1,73 m ² como variável dependente em portadores de DM1 no sexo masculino.....	55
Tabela 18. Distribuição da frequência dos genótipos do SNP <i>TXNIP</i> +402 T/C de acordo com a presença ou ausência de ND estabelecida.....	56
Tabela 19. Análise de regressão logística com a nefropatia diabética estabelecida como variável dependente em portadores de DM1	56
Tabela 20. Distribuição da frequência dos genótipos do SNP <i>TXNIP</i> +402 T/C de acordo com a presença ou ausência de ND estabelecida no sexo masculino.....	57
Tabela 21. Análise de regressão logística com a nefropatia diabética estabelecida como variável dependente em portadores de DM1 do sexo masculino.....	57

Tabela 22. Distribuição da frequência dos genótipos do SNP <i>TXNIP</i> +402 T/C de acordo com a presença ou ausência de ND franca no sexo masculino.....	58
Tabela 23. Análise de regressão logística com a nefropatia diabética franca como variável dependente em portadores de DM1 do sexo masculino.....	58
Tabela 24. Análise das características clínicas e laboratoriais dos pacientes do sexo masculino de acordo com o genótipo do SNP <i>TXNIP</i> +402 T/C.....	59
Tabela 25. Frequência dos genótipos do SNP -2763 A/G do gene <i>GLRX</i> em portadores de DM1 e em indivíduos controle não diabéticos	60
Tabela 26. Frequência dos genótipos do SNP -3787 T/G do gene <i>TKT</i> em portadores de DM1 e em indivíduos controle não diabéticos	61
Tabela 27. Frequência dos genótipos do SNP -1410 T/C do gene <i>TKT</i> em portadores de DM1 e em indivíduos controle não diabéticos	62
Tabela 28. Resumo das associações encontradas no estudo.....	64

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

O ₂ ⁻	Radical superóxido
3'UTR	Região 3' não traduzida
γ-CGS	γ-glutamilcisteína sintetase
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AGE	Produtos finais de glicação avançada
AP-4	<i>Activating enhancer binding protein 4</i>
BRA	Inibidor do receptor da angiotensina II
CAT	Catalase
CLOX	<i>Cut like homeobox</i>
DCCT	<i>Diabetes Control and Complication Trial</i>
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EAU	Excreção de albumina urinária
F6P	Frutose-6-fosfato
GA3P	Gliceraldeído-3-fosfato
GCLC	Subunidade catalítica da □-CGS
GLRX-1	Glutarredoxina 1
GLRX-2	Glutarredoxina 2
GLRXs	Glutarredoxinas
GPXs	Glutationas peroxidases
GPX-4	Glutationa peroxidase 4
GSH	Glutationa reduzida
GSR	Glutationa redutase

GSS	Glutationa sintetase
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA _{1c}	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HNF-4	<i>Hepatocyte nuclear factor 4</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HSPE	Hospital do Servidor Público Estadual
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IECA	Inibidor da enzima conversora da angiotensina
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDRD	<i>Modification of diet in renal disease</i>
NADPH	Nicotinamida adenina difosfato
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND	Nefropatia diabética
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NGSP	<i>National Glyco Hemoglobin Standardization Program</i>
NO	Óxido nítrico
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
OH·	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial da Saúde

OR	<i>Odds ratio</i>
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio 1
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PKC	Proteína cinase C
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos
RFG	Ritmo de filtração glomerular
RFGe	Ritmo de filtração glomerular estimado
RFLP	Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RXR	Receptor de retinóide X
SDS	Sódio dodecil sulfato
SECIS	Sequência de inserção de selenocisteína
SMARCA 3	<i>Helicase like transcription factor</i>
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
SOD	Superóxido dismutase
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDP	Tiamina difosfato
TE	Tris-EDTA
TG	Triglicérides
TGF- β	Fator de crescimento transformante- β
TK	Transcetolase
TKTL1	<i>Transcetolase-like gene 1</i>
TKTL2	<i>Transcetolase-like gene 2</i>
TXN	Tiorredoxina
TXNIP	Proteína de interação com a tiorredoxina
TXNRD1	Tiorredoxina redutase 1

TXNRD2	Tiorredoxina redutase 2
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VPF	Via da pentose fosfato

RESUMO

Monteiro MBCA. *Polimorfismos nos genes que codificam a glutatona peroxidase-4, a tioredoxina e a proteína de interação com a tioredoxina modulam a susceptibilidade à doença renal em portadores de diabetes mellitus tipo 1* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUÇÃO: evidências sugerem a participação de fatores genéticos na susceptibilidade para o desenvolvimento das complicações renais em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Vários genes relacionados às vias bioquímicas induzidas pela hiperglicemia têm sido investigados e o estresse oxidativo foi reconhecido como o principal mecanismo patogênico responsável pelo dano celular causado pela hiperglicemia no DM. Assim, genes que codificam enzimas que participam de vias antioxidantes endógenas são candidatos a conferirem susceptibilidade, ou proteção, contra as complicações renais. Os sistemas da glutatona, glutarredoxina, tioredoxina e a enzima transcetolase são importantes mecanismos de defesa celular contra o estresse oxidativo. **OBJETIVOS:** avaliar a associação entre os seguintes polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) e a doença renal em pacientes diabéticos tipo 1: -2030 T/G (rs34071297) e +718C/T (rs713041) no gene que codifica a glutatona peroxidase 4 (GPX4); -3310 G/C (rs10427424) no gene que codifica a glutatona sintetase (GSS); -247 A/G (rs2978668) no gene que codifica a glutatona redutase (GSR); -2763 A/G (rs6556885) no gene que codifica a glutarredoxina (GLRX); -224 T/A (rs2301242) no gene que codifica a tioredoxina (TXN); +402 T/C (rs7211) no gene que codifica a proteína de interação com a tioredoxina (TXNIP); -192 G/A (rs3788319) no gene que codifica a tioredoxina redutase 2 (TXNRD2) e -3787 T/G (rs7637934) e -1410 T/C (rs11130365) no gene que codifica a transcetolase (TKT). **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** 443 pacientes (192 do sexo masculino e 251 do sexo feminino) com DM1 com mais de 10 anos de diagnóstico foram classificados conforme a presença ou ausência das seguintes complicações: (1) nefropatia diabética franca (ND), definida por macroalbuminúria a proteinúria persistente; (2) nefropatia diabética estabelecida (NDE), definida por macroalbuminúria a proteinúria persistente ou RFGe < 60 mL/min/1,73 m² ou pacientes em terapia de substituição renal e (3) ritmo de filtração glomerular estimado (RFGe) ≥ ou < que 60 mL/min/1,73 m². O teste de Pearson χ^2 foi usado para comparar as frequências dos genótipos e a magnitude de associação foi estimada pelo cálculo do *odds ratios* (OR). A OR ajustada foi estimada por regressão logística para possíveis fatores de confusão (sexo, idade ao diagnóstico, tempo de diabetes, HbA1c, concentrações plasmáticas de colesterol e triglicérides e presença de hipertensão arterial). Pacientes controle não diabéticos também foram incluídos para avaliar se os SNPs não confeririam susceptibilidade para o DM1. **RESULTADOS:** A presença de pelo menos um alelo T do polimorfismo +718C/T no gene *GPX4* conferiu proteção para a presença de ND estabelecida (OR=0,41; IC 95% 0,19-0,83, p= 0,0146) e ND franca (OR=0,37; IC 95% 0,15-0,85; p= 0,021) na população masculina mesmo após ajuste para os fatores de confusão e a presença de dois alelos polimórficos A no polimorfismo -224 T/A no gene *TXN* conferiu risco para a presença de ND franca na população feminina após ajuste para os fatores de confusão (OR= 4,06; IC 95% 1,59-10,6, p= 0,0035). O genótipo TT para o SNP +402 T/C do gene da *TXNIP* foi mais frequente nos pacientes portadores de DM1 em relação aos controles não diabéticos. O genótipo CC do SNP *TXNIP* +402 T/C conferiu proteção para a presença de ND estabelecida em homens mesmo após ajuste para os fatores de confusão (OR=0,45; IC 95% 0,22-0,91; p= 0,02). **CONCLUSÕES:** Os SNPs +718C/T (rs713041) no gene *GPX4*, -224 T/A (rs2301242) no gene *TXN* e +402 T/C (rs7211) no gene *TXNIP*, modulam o risco para o comprometimento renal na população de portadores de DM1 estudada

Descritores: diabetes mellitus tipo 1, nefropatias diabéticas, estresse oxidativo, polimorfismos de um único nucleotídeo, tioredoxinas, glutatona

SUMMARY

Monteiro MBCA. *Polymorphisms in the genes coding for glutathione peroxidase-4, thioredoxin and thioredoxin interaction protein modulate the risk for renal disease in type 1 diabetes patients* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUCTION: there is evidence suggesting that genetic factors are involved in the susceptibility to the development of renal complications in patients with type 1 diabetes mellitus (DM1). Several genes related to the mechanisms of hyperglycemia-induced cell damage have been investigated. Oxidative stress is recognized as a major pathogenic factor of cellular damage caused by hyperglycemia. Thus, genes that encode enzymes involved in endogenous antioxidant pathways may be candidates for conferring risk or protection against renal complications. The glutathione, glutaredoxin, and thioredoxin systems and transketolase enzyme are important mechanisms of cellular defense against oxidative stress. **OBJECTIVES:** to evaluate the association between the following single nucleotide polymorphisms (SNPs) and renal disease in type 1 diabetic patients: -2030 T/G (rs34071297) and +718C/T (rs713041) in the gene encoding glutathione peroxidase 4 (*GPX4*); -3310 G/C (rs10427424) in the gene encoding glutathione synthetase (*GSS*); -247 A/G (rs2978668) in the gene encoding glutathione reductase (*GSR*); -2763 A/G (rs6556885) in the gene encoding glutaredoxin (*GLRX*); -224 T/A (rs2301242) in the gene encoding thioredoxin (*TXN*); +402 T/C (rs7211) in gene encoding thioredoxin interacting protein (*TXNIP*); -192 G/A (rs3788319) in the gene encoding thioredoxin reductase 2 (*TXNRD2*); -3787 T/G (rs7637934) and -1410 T/C (rs11130365) in the gene encoding transketolase (*TKT*). **MATERIALS AND METHODS:** 443 patients (192 males and 251 females) with type 1 diabetes duration > 10 years were grouped according to presence or absence of the following complications: (1) overt diabetic nephropathy (DN) defined by persistent macroalbuminuria to proteinuria; (2) established diabetic nephropathy (EDN), defined by persistent macroalbuminuria or proteinuria or estimated glomerular filtration rate (RFGe) < 60 mL/min/1.73 m² or patients under renal replacement therapy and (3) RFGe ≥ or < 60 mL/min/1.73 m². Pearson's χ^2 test was performed to compare the genotype frequencies and magnitude of association was estimated using odds ratios (OR). Adjusted OR was estimated by logistic regression for possible confounders (sex, age at diagnosis, diabetes duration, HbA1C, cholesterol and triglyceride concentrations and the presence of hypertension). Nondiabetic subjects were also included. **RESULTS:** The presence of at least one T polymorphic allele of the SNP *GPX4* +718 C/T was protective against EDN (OR = 0.41, CI 95% 0.19-0.83, p= 0.0146) and against overt DN (OR=0.37; IC 95% 0.15-0.85; p= 0.021) in the male population even after adjustment for possible confounders. The presence of two polymorphic alleles of the SNP *TXN* -224 T/A conferred independent risk for the presence of overt DN in the female population after adjustment for possible confounders (OR = 4.06, CI 95% 1.59-10.6, p= 0.0035). The TT genotype for the SNP *TXNIP* +402 T/C was more frequent in patients with type 1 diabetes compared to nondiabetic controls. The genotype CC of the SNP *TXNIP* +402 T/C was protective against EDN in male population even after adjustment for possible confounders (OR=0.45; IC 95% 0.22-0.91; p= 0.02) **CONCLUSIONS:** The SNPs *GPX4* +718C/T (rs713041), *TXN* -224 T/A (rs2301242) and *TXNIP* +402T/C (rs7211) modulate the risk for renal disease in the studied population of type 1 diabetes patients.

Keywords: type 1 diabetes mellitus, diabetic nephropathies, oxidative stress, single nucleotide polymorphism, thioredoxin, glutathione

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hiperglicemia e complicações crônicas do diabetes

O diabetes mellitus (DM) tipo 1 é responsável por, aproximadamente, 5 a 10% de todos os casos de DM no hemisfério ocidental. Caracteristicamente apresenta-se como um estado de desordem catabólica no qual a insulina circulante é virtualmente inexistente secundariamente à destruição das células β de natureza auto-imune.

Devido à microangiopatia, o DM é uma das principais causas de cegueira, insuficiência renal crônica e neuropatias debilitantes. O controle intensivo do DM diminui a frequência de complicações microvasculares, porém, está associado ao aumento do número de hipoglicemias⁽¹⁾.

Evidências substanciais atualmente demonstram que a frequência, a gravidade, e o progresso da retinopatia, nefropatia e neuropatia estão relacionados ao grau de hiperglicemia ao longo do tempo. Essa conclusão tem origem nos estudos epidemiológicos, clínicos e patológicos realizados em seres humanos; estudos com modelos animais; e na elucidação de mecanismos bioquímicos, envolvidos na patogênese dessas complicações diretamente desencadeados pela hiperglicemia⁽²⁾. Um desses estudos foi o *Diabetes Control and Complication Trial* (DCCT), que mostrou que o controle intensivo da glicemia em pacientes com DM1, sem complicações após 6,5 anos de seguimento, resultou numa glicemia média de 155 mg/dL, contra 230 mg/dL naqueles com controle convencional. Isso resultou numa redução de 54 a 76% no risco de desenvolvimento de retinopatia; 39 a 54% para microangiopatia e de 60% para neuropatia⁽³⁾. Esses resultados foram

semelhantes ao *Stockholm Diabetes Intervention Study*, de Richards e cols., fornecendo evidências conclusivas da ligação entre hiperglicemia e as complicações microvasculares⁽⁴⁾.

A doença renal é, de forma geral, de ocorrência comum nos indivíduos portadores de DM. Fatores adquiridos e genéticos são mencionados para explicar o desenvolvimento da doença renal diabética⁽²⁾. A nefropatia diabética (ND) é basicamente caracterizada por hipertrofia renal e glomerular, proteinúria persistente, progressivo declínio do ritmo de filtração glomerular (RFG) e hipertensão⁽⁵⁾.

Acredita-se que a incidência de ND aumente cinco anos após o diagnóstico de DM1, atinja a incidência máxima de cinco a 15 anos e, a seguir, diminua gradualmente⁽⁶⁾. A incidência cumulativa de ND observada nos estudos mais antigos varia de 25% a 40% após 25 anos de DM1. Nos estudos mais recentes, a incidência cumulativa de ND após 20 anos de doença varia de 3,6% a 13,7%, o que provavelmente reflete o melhor controle pressórico e glicêmico dos pacientes nas últimas décadas⁽⁷⁾.

1.2 Hiperglicemia e Estresse oxidativo

Vários mecanismos são propostos para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia, sendo os principais: aumento da ativação das vias dos polióis; aumento da formação dos produtos finais de glicação avançada (*advanced glycation end-products* ou AGEs); da proteína cinase C

(PKC) e da via do hexosamina. Esses mecanismos são apresentados resumidamente a seguir:

A. Aumento da ativação da via dos polióis – devido ao aumento da glicose intracelular, esta é convertida à sorbitol pela ação da enzima aldose redutase. A redução da glicose a sorbitol consome nicotinamida adenina difosfato (NADPH), que é necessária para a regeneração de glutathiona reduzida (GSH) pela enzima glutathiona redutase, induzindo ou exacerbando o estresse oxidativo intracelular.

B. Aumento da formação dos AGEs – devido à reação não enzimática do grupo aldeído reativo da glicose com o grupo amino das proteínas, resultando na formação dos produtos de Amadori, dos quais o mais conhecido é a hemoglobina glicada (HbA_{1c}). Outras reações ocorrem a partir deste ponto para produzir um grupo de compostos denominados AGEs. Uma das principais vias de detoxificação dos AGEs é o sistema da enzima glioxalase. O principal substrato para esse sistema é o metiogloxal, e a GSH atua como um cofator dessa reação.

C. Aumento da ativação da proteína cinase C (PKC) - a ativação da PKC resulta em diminuição da produção de óxido nítrico (NO), aumento da atividade da endotelina-1, alteração na expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), do fator de crescimento transformante β (TGF- β) e do inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) e ainda ativação do NF- κ B e do sistema NADPH oxidase.

D. Aumento da ativação da via da hexosamina – devido a um desvio da glicose intracelular em excesso para a via da hexosamina, onde é

convertida à frutose-6-fosfato (F6F). A F6F é transformada em N-acetil glicosamina-6-fosfato e, posteriormente, em *N*-acetilglicosamina 1,6-fosfato, e à UDP-*N*-acetilglicosamina. Esta última é substrato para glicosilação de proteínas intracelulares, alterando sua função.

A representação esquemática das vias mencionadas é demonstrada na Figura 1.

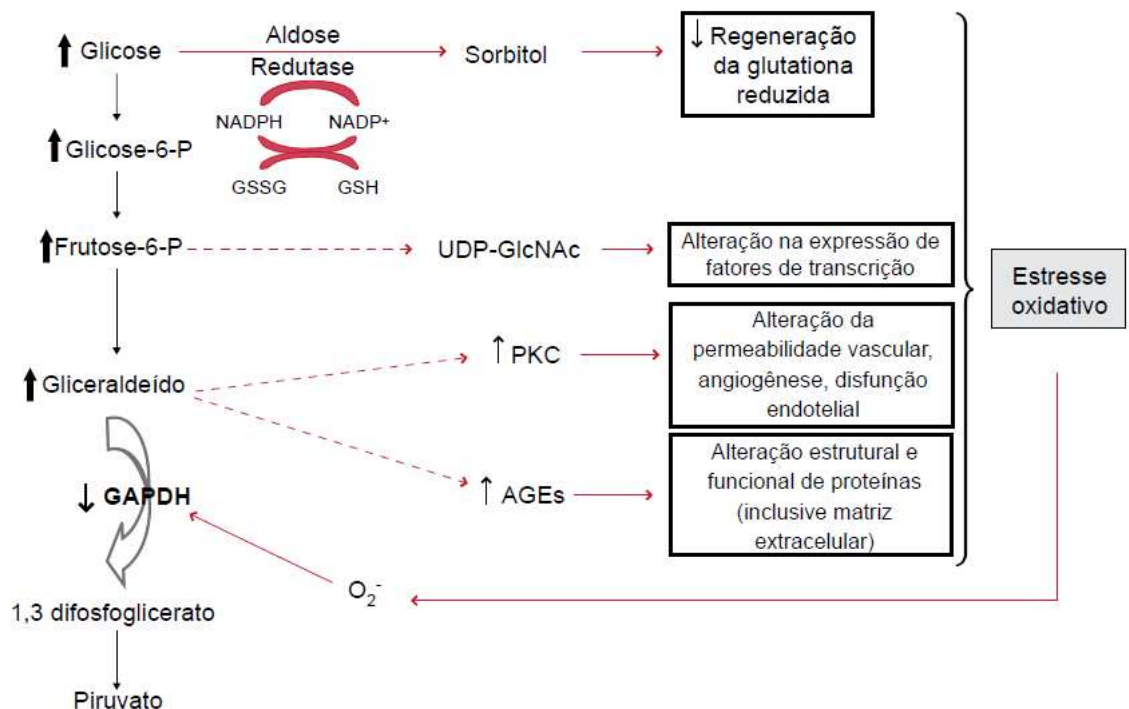


Figura 1. Mecanismos propostos para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia. Adaptado de Browlee, 2001⁽¹⁾

Recentemente o estresse oxidativo foi proposto como o elemento unificador de todas essas vias, na instalação das complicações diabéticas⁽⁸⁾. O estresse oxidativo se estabelece quando as defesas intracelulares anti-oxidantes são insuficientes para detoxificar um conjunto de moléculas denominadas espécies reativas de oxigênio (ROS), e/ou quando há

produção excessiva de ROS. Durante o metabolismo normal, o oxigênio é reduzido à água e, neste processo, os produtos intermediários são o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH\cdot$), que são as chamadas ROS. Esses compostos são extremamente reativos e têm meia vida ultracurta, pois a presença de um elétron não-pareado os faz reagir com moléculas de DNA, proteínas e lipídios. Assim, a avaliação do estresse oxidativo é feita pela mensuração dos compostos modificados por ROS.

Os níveis de todos os marcadores do estresse oxidativo estão modificados em pacientes portadores de DM⁽⁹⁾ tipo 1⁽¹⁰⁾ e tipo 2⁽¹¹⁾. Em pacientes com DM2, há evidências de peroxidação dos lipídios pela alta concentração plasmática⁽¹²⁾ e urinária de isoprostanos. A formação de nitrotirosinas é aumentada em pacientes com ambos os tipos de DM⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Existem várias evidências sugerindo que uma predisposição genética participe da susceptibilidade para o desenvolvimento das complicações microvasculares no DM1, tais como a sua agregação familiar⁽¹⁶⁾ e a concordância da gravidade da lesão glomerular em indivíduos de uma mesma família⁽¹⁷⁾. Inúmeros genes relacionados aos mecanismos dos danos induzidos pela hiperglicemia já foram investigados⁽¹⁸⁾. Devido ao papel desempenhado pelo estresse oxidativo na patogênese das complicações crônicas do DM, os genes que codificam enzimas que participam dos mecanismos anti-oxidantes são candidatos a conferirem susceptibilidade, ou proteção, contra as complicações crônicas.

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), os sistemas glutathiona, tioredoxina e glutaredoxina. Além desses, a transcetolase (TK), uma enzima dependente de tiamina difosfato, catalisa uma série de reações chave do ramo não-oxidativo da via da pentose fosfato (VPF). Trabalhos recentes têm sugerido que a TK é importante no DM, pois em condições de hiperglicemia, o excesso de alguns produtos da via glicolítica podem ser desviados pela TK para a VPF⁽¹⁹⁾.

Há também macromoléculas como albumina e ceruloplasmina e moléculas pequenas como vitamina C e E, beta-caroteno e ácido úrico que participam deste processo^(20, 21).

1.2.1 O sistema glutathiona

A glutathiona (GSH) é uma molécula ubíqua produzida intracelularmente em todos os órgãos e tipos celulares, porém mais abundante no fígado e pulmões. Em torno de 85 a 90% estão livremente distribuídos no citoplasma, no entanto, podem estar também compartimentalizados em organelas como mitocôndria, peroxissomos, matriz nuclear e retículo endoplasmático. A GSH é um potente agente redutor, agindo como um doador de prótons, assim como cofator de conjugados nucleofílicos. Como maior anti-oxidante intracelular do organismo, a

depleção de GSH pode ser tanto causa como pré-requisito para formação de ROS⁽²²⁾.

Inúmeros estudos já mostraram que o DM causa profundas alterações no metabolismo e transporte da GSH, que medeia o estado redox da célula. Diversas complicações do DM, como lesões nervosas periféricas, malformações fetais e angiopatias têm sido associadas à depleção de GSH e, conseqüentemente, à formação de ROS⁽²²⁾.

A GSH é um tripeptídeo composto pelos aminoácidos glutamina, cisteína e glicina. Sua síntese requer a ação consecutiva de duas enzimas, a primeira (etapa limitante) é a γ -glutamilcisteína sintetase (γ -CGS) e a seguir a glutathione sintetase (GSS). A GSH pode também ser sintetizada por meio de vias de recuperação que envolvem seu catabolismo ou por intermédio de reciclagem após sua oxidação⁽²²⁾ pela enzima glutathione redutase (GSR). A glutathione detoxifica uma série de compostos por meio da enzima glutathione S-transferase (GST) e das glutathione peroxidases (GPXs). A diminuição das concentrações de GSH foi demonstrada em pacientes com DM e complicações microvasculares, correlacionando-se diretamente com o controle glicêmico⁽²³⁾.

Estudo recente de nosso laboratório mostrou que num universo de 401 pacientes portadores de DM1 com mais de 10 anos de diagnóstico e mau controle glicêmico, a presença de pelo menos um alelo T do polimorfismo -129 C/T (rs1788390) no gene *GCLC* (codifica a subunidade catalítica da enzima γ -CGS), conferiu risco para a presença de RFG < 60 mL/min/1,73 m² na população de pacientes estudada. A presença do alelo T

está associada a uma menor atividade transcricional da região promotora do gene e é possível que resulte em uma inabilidade de aumentar as concentrações da enzima γ -CGS durante o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia. Como essa é uma enzima-chave na síntese da GSH, especulou-se que a presença do alelo T poderia resultar em menores concentrações de GSH, o que aumentaria a susceptibilidade das células à lesão induzida por ROS⁽²⁴⁾.

Existem diversas outras enzimas da via da GSH que também podem estar envolvidas no desenvolvimento das complicações diabéticas, já que participam desse importante sistema de defesa anti-oxidante. Algumas delas, e respectivos SNPs candidatos estão descritas a seguir:

Glutathionas peroxidases (GPXs) - são enzimas que catalisam a inativação do oxigênio reativo e espécies de nitrogênio utilizando a GSH para formar a glutathiona oxidada (GSSG). Esta é novamente reduzida pela enzima GSR, que utiliza como cofator o NADPH formado no ciclo das pentoses. No entanto, a hiperglicemia crônica leva ao aumento da ativação da via dos polióis com um maior consumo de NADPH, diminuindo sua disponibilidade para a redução da GSSG pela GSR. Até o momento, cinco tipos de GPX foram descritas em humanos: GPX-1(hepática), GPX-2, GPX-3, GPX-4 e GPX 5.

A glutathiona peroxidase 4 (GPX-4) é detectada na maioria dos tecidos, tanto no citosol, como associado a membranas. O gene que a codifica contém sete éxons e está localizado no braço curto do cromossomo 19, na posição 19p13.3. Esta enzima existe como monômero, em contraste com

outras GPXs, que são tetrâmeros. Seu pequeno tamanho e superfície hidrofóbica estão implicadas na habilidade desta enzima de reduzir fosfolípidos peroxidados⁽²⁵⁾ e colesterol⁽²⁶⁾ nas membranas. De fato, tem sido proposto que GPX-4 pode ter papel primário na proteção das células contra o estresse oxidativo⁽²⁷⁾.

Alguns polimorfismos em regiões nas quais se ligam fatores de transcrição foram observados na região promotora do gene *GPX4*, dentre eles o SNP -2030 G/T (rs34071297) foi identificado na potencial região de ligação do NF-κB/c-Rel⁽²⁸⁾. O NF-κB foi descrito como um importante mediador da expressão gênica da GPX em músculo esquelético e está envolvido no aumento da resposta da GPX ao estresse oxidativo⁽²⁹⁾.

O polimorfismo 718C/T (rs713041) na região 3'UTR do gene também se mostrou interessante, pois já foi descrito como funcional⁽³⁰⁾ e está associado à susceptibilidade ao câncer colorretal⁽³¹⁾ e ao metabolismo da lipoxigenase⁽³²⁾.

Glutathione Sintetase (GSS) – Esta enzima é um homodímero com 52 kDa e o gene que a codifica está localizado no cromossomo 21q11.2⁽³³⁾. É responsável pela adição de cisteína ao dipeptídeo γ-glutamilcisteína, formando a GSH. Dentre os polimorfismos já identificados na região promotora do gene *GSS*, o SNP -3310 C/G (rs10427424) localiza-se numa região de potencial ligação do fator de transcrição Nrf2⁽²⁸⁾. Este fator é descrito como um elemento controlador da regulação gênica da resposta anti-oxidante ao estresse oxidativo, sendo demonstrado que ele age como um regulador crítico da defesa contra ROS em coração de camundongos

normais e portadores de DM⁽³⁴⁾. Demonstrou-se também que ratos portadores de DM com *knockout* para o gene *Nrf2* tiveram sua função renal mais seriamente afetada que os controles, sugerindo que este fator de transcrição possa ter papel importante contra os danos renais causados pela hiperglicemia⁽³⁵⁾.

Glutathione Redutase (GSR) – É descrita como tendo seu nível de expressão regulado pelo estresse oxidativo⁽³⁶⁾, uma vez que a GSSG é reduzida pela ação da GSR. A atividade aumentada de GSR foi descrita como protetora no DM induzido por estreptozotocina em um estudo de Nagaoka⁽³⁷⁾. O gene que codifica esta enzima está localizado no cromossomo 8p21 e sua ação requer NADPH como doador de elétron, que é mantido predominantemente pela VPF⁽²²⁾. Um estudo com pacientes portadores de DM 2, com média de 16 anos de diagnóstico, mostrou que a atividade de GPX e GSR em eritrócitos humanos é menor naqueles com mau controle glicêmico, mostrando que a hiperglicemia leva à menor ativação de GPX e GSR, e que isso pode contribuir para o início ou progressão de complicações relacionadas à doença⁽³⁸⁾.

Foi identificado na região promotora do gene *GSR* o SNP -247 A/G (rs2978668) em uma provável sequência de ligação do NF-κB⁽²⁸⁾, que pode ativar uma grande variedade de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo⁽³⁹⁾. Além disso, sequências de ligação para este fator de transcrição foram encontradas em regiões regulatórias de genes que são induzidos pelo estresse oxidativo⁽⁴⁰⁾.

1.2.2 O sistema glutarredoxina

As glutarredoxinas (GLRXs) são proteínas pequenas com 9-15 kDa e que apresentam um grande número de isoformas. Com base em seus sítios ativos, as GLRXs podem ser divididas em duas categorias principais: ditióis GLRXs, contendo em seu sítio ativo principal Cys-Pro-Tyr-Cys e monotióis GLRXs, que contém Cys-Gly-Phe-Ser em seu sítio ativo⁽⁴¹⁾.

Além disso, podem existir em duas formas principais: GLRX-1, que se localiza no citosol e GLRX-2, que se localiza principalmente nas mitocôndrias, mas também no núcleo. Ambas GLRX-1 e GLRX-2 têm uma função crucial na regulação redox e protegem as células contra a apoptose⁽⁴²⁾.

As GLRXs são definidas por sua habilidade de catalisar a redução de proteínas dissulfídicas e usar GSH como substrato redutor, sendo descritas como redutoras dependentes de GSH que catalizam a S-glutationilação reversível de proteínas⁽⁴¹⁾ (Figura 2). Dada a importância desses processos, as GLRXs têm sido implicadas em várias condições fisiológicas e patológicas como nas infecções e no sistema imune, no sistema cardiovascular, pulmonar, reprodutor, na apoptose celular e no câncer⁽⁴¹⁾.

Já foi demonstrado que a hiperglicemia leva ao aumento da atividade de GLRX em células da retina de ratos, sendo importante no desenvolvimento de retinopatia diabética, na medida em que aumenta a translocação nuclear do NF-κB e a expressão de ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), uma proteína pró-inflamatória que está implicada na

patogênese da retinopatia⁽⁴³⁾. Demonstrou-se também que o sistema GLRX exerce um importante papel de reparo contra o estresse oxidativo em coração de ratos portadores de DM⁽⁴⁴⁾.

Dentre os SNPs descritos na região promotora de *GLRX*, o polimorfismo -2763 A/G (rs6556885) foi identificado como próximo à região de provável ligação ao receptor ativado por proliferador de peroxissomos e ao receptor X retinóide (PPAR-RXR)⁽²⁸⁾. O PPAR/RXR forma heterodímeros que regulam a transcrição de genes envolvidos na ação da insulina, diferenciação de adipócitos, metabolismo lipídico e inflamação⁽⁴⁵⁾.

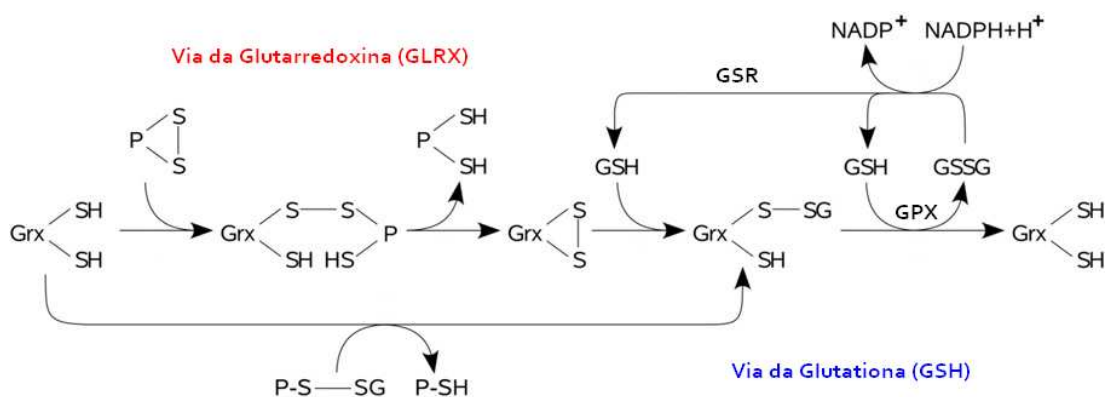


Figura 2. Representação esquemática da via da glutaciona juntamente com a via da glutarredoxina. Grx – glutarredoxina; GSH – glutaciona reduzida; GSSG – glutaciona oxidada; GPX – glutaciona peroxidase; GSR – glutaciona redutase. Adaptado de Lillig, Berndt e Holmgren, 2008⁽⁴¹⁾

1.2.3 O sistema tiorredoxina

O sistema tiorredoxina é composto pela tiorredoxina (TXN), pelas tiorredoxinas redutases (TXNRD1 e TXNRD2) e por NADPH e exerce um papel importante na manutenção do estado redox intracelular. Os sistemas TXN e GSH são considerados os dois principais sistemas anti-oxidantes redutores de tiol e ambos têm expressão ubíqua⁽⁴⁶⁾.

Este sistema é responsável pela redução de grupos cisteína oxidados em proteínas, por meio da interação com o centro redox ativo da TXN (-Cys-Gly-Pro-Cys). A TXN oxidada formada é reduzida com a ajuda de TXNRDs e NADPH. É sabido que a TXN realiza a maior parte de sua função anti-oxidante por intermédio de peroxirredoxinas, também chamadas de tiorredoxinas peroxidases⁽⁴⁷⁾. Alterações deste sistema estão implicadas em diversas condições patológicas, entre elas, as complicações do DM⁽⁴⁷⁾. A Figura 3 apresenta de forma esquemática e simplificada o sistema TXN.

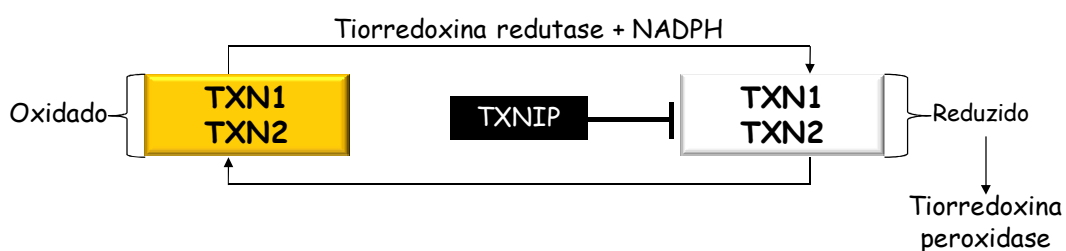


Figura 3. Representação esquemática da via da tiorredoxina. TXN1 tiorredoxina 1; TXN2 – tiorredoxina 2; TXNIP – proteína de interação com tiorredoxina. Adaptado de Maulik, N; Das, DK⁽⁴⁷⁾

Já foi demonstrado que o aumento da expressão de TXN em animais e pacientes portadores de DM protege as células β -pancreáticas^(48, 49) e que

seu inibidor endógeno, a proteína de interação com tiorredoxina (TXNIP) tem papel tóxico nas mesmas células e é mais expressa em rins de pacientes portadores de DM^(50, 51).

O SNP -224 T/A (rs2301242) no gene *TXN* está próximo a uma provável sequência de ligação ao fator AP-4 (*activating enhancer binding protein 4*) e ao códon de iniciação do gene⁽²⁸⁾.

1.2.4 Transcetolase

A transcetolase (TK) catalisa uma série de reações chave do ramo não-oxidativo da VPF e pode desviar o excesso de alguns produtos da via glicolítica para a VPF em vigência de hiperglicemia. Ela é um homodímero com massa molecular de 74,2 kDa por monômero e possui dois sítios ativos de igual atividade catalítica. Essa enzima tem um papel importante, uma vez que provê precursores para nucleotídeos, aminoácidos aromáticos e biossíntese de vitaminas⁽⁵²⁾.

Até agora, um gene TK (*TKT*) e dois *transcetolase-like* genes (*TKTL1* e *TKTL2*) foram identificados no genoma humano. A proteína TKTL1 é descrita com tendo papel crucial na carcinogênese e pode ter implicações importantes na nutrição e no tratamento de pacientes com câncer. Autores também relatam a existência de variantes de TK, bem como atividade reduzida dessa enzima em pacientes com doenças neurodegenerativas, DM e câncer⁽⁵²⁾.

De acordo com Zhao (2009), algumas evidências têm sugerido que a TK é importante no DM. Em condições de hiperglicemia, o excesso dos produtos da glicólise frutose-6-fosfato (F6F) e gliceraldeído-3-fosfato (GA3P), envolvidos na ativação da via das hexosaminas, da PKC e dos AGEs, podem ser desviados para a VPF, após a ativação da TK (Figura 4). Essa enzima serve como ponte entre a parte oxidativa da VPF e o metabolismo oxidativo da glicose, permitindo a adaptação celular às várias necessidades metabólicas em diferentes condições ambientais⁽¹⁹⁾. Portanto, a TK tem sido proposta como um alvo novo para a prevenção e tratamento das complicações crônicas do diabetes⁽⁵²⁾.

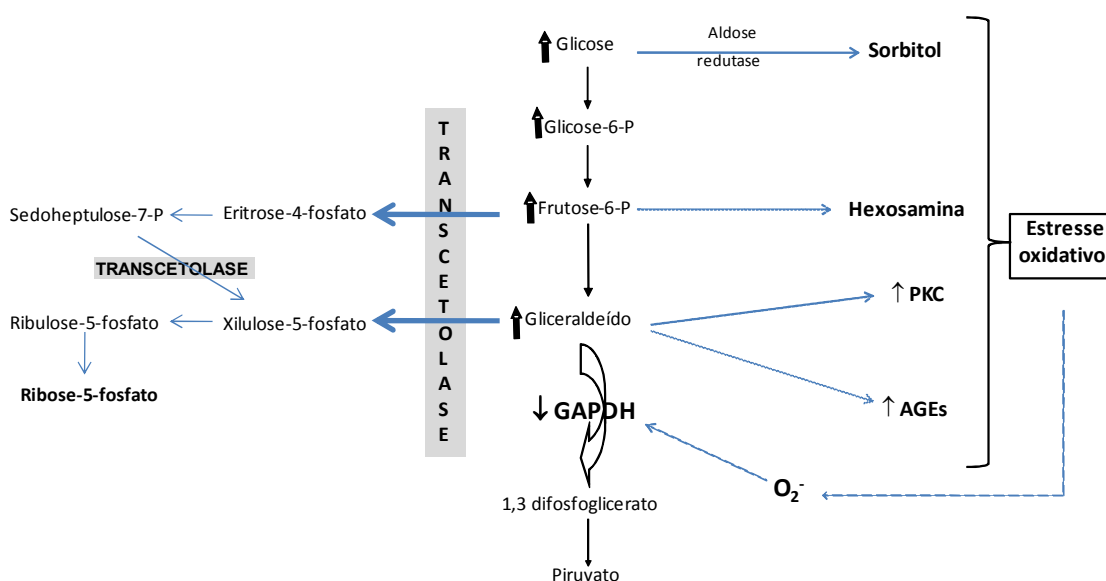


Figura 4: Desvio metabólico de frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato da via glicolítica para a via da pentose fosfato pela ativação da enzima transcetolase. Adaptado de Babaei-Jadidi R, et al., 2003⁽⁵³⁾

Dentre os SNPs já descritos na região promotora do gene *TK* dois mostraram-se interessantes: o -3787 T/G (rs7637934) e -1410 T/C (rs11130365). O SNP -3787 T/G está próximo à região de provável ligação

ao fator de transcrição PPAR- γ quando o alelo ancestral T é substituído pelo alelo polimórfico G⁽²⁸⁾.

O SNP -1410 T/C também está próximo a uma região de provável ligação ao fator de transcrição SMARCA 3⁽²⁸⁾.

1.3 Estudo de polimorfismos candidatos e a associação com as complicações diabéticas

Por não existirem fortes preditores, além da hiperglicemia e da hipertensão arterial sistêmica (HAS), para o desenvolvimento de complicações no DM, marcadores genéticos têm sido estudados na tentativa de identificar pacientes sob maior risco. Neste sentido, duas principais estratégias são usadas para explorar o genoma humano: a primeira delas é conhecida como rastreamento genômico (*genome scan*), que identifica genes não com base em suas funções, mas sim em sua posição no genoma. Como as regiões de estudo, em geral, são de grande extensão, é necessário que se avalie quais genes presentes naquela região podem ser relevantes na doença em questão e o mesmo deve ser sequenciado nos pacientes acometidos para o rastreamento de mutações. Na segunda estratégia, investigam-se genes envolvidos em vias biológicas específicas relacionadas ao que se conhece da fisiopatologia da doença que está sendo estudada.

Aproximadamente 0,1% da sequência do genoma diferem entre os seres humanos e a maioria dessas diferenças corresponde a polimorfismos (variações presentes em mais de 1% da população). A forma mais comum

de polimorfismo é conhecida por SNP (*single nucleotide polymorphism*), na qual há troca, inserção ou deleção de um único nucleotídeo na molécula de DNA⁽¹⁸⁾.

Essas mudanças de nucleotídeos podem ser do tipo transição – substituição de uma base púrica por outra púrica - ou transversão – substituição de uma base púrica por uma pirimidínica e vice-versa. As alterações de sequência causadas por SNPs podem causar modificações na sequência de aminoácidos (variações não-sinônimas), podem ser silenciosas (sinônimas), ou simplesmente ocorrer em regiões não-codificadoras. Alguns desses polimorfismos são funcionais, por serem capazes de influenciar a expressão gênica, aumentando ou diminuindo a quantidade final da proteína codificada por aquele gene⁽⁵⁴⁾. Sendo assim, a identificação das variações em genes e análise de seus efeitos pode levar a um melhor entendimento de seu impacto na função gênica e na saúde de cada indivíduo⁽⁵⁵⁾.

A predisposição às doenças poligênicas como obesidade, DM e suas complicações é determinada por esses polimorfismos. A associação entre SNPs e alterações funcionais é atualmente uma poderosa ferramenta de estudo de doenças poligênicas⁽⁵⁶⁾.

A ausência de fortes fatores preditivos para o desenvolvimento de complicações microvasculares em portadores de DM, além da hiperglicemia e da hipertensão, estimula a busca por marcadores genéticos para identificação de pacientes de risco. Esses pacientes poderiam ter seu tratamento otimizado, enquanto os pacientes que fossem identificados como

geneticamente protegidos poderiam ter um controle glicêmico um pouco menos rigoroso, já que a terapia intensiva implica em maior frequência de hipoglicemias, além da dificuldade de aderência a essa modalidade de tratamento⁽⁵⁷⁾.

Adicionalmente, o estudo de marcadores genéticos permite melhor compreensão da patogênese das complicações, o que pode possibilitar o desenvolvimento de novas terapias direcionadas para prevenção e tratamento⁽¹⁸⁾.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a frequência de polimorfismos de um único nucleotídeo em genes que codificam enzimas das vias da glutathiona, tioredoxina, glutarredoxina e da pentose fosfato e sua associação com a doença renal em pacientes portadores de DM1. Os seguintes polimorfismos foram avaliados:

- *GPX4*: SNPs -2030 T/G (rs34071297) e +718C/T (rs713041);
- *GSS*: SNPs -3310 G/C (rs10427424);
- *GSR*: SNP-247 A/G (rs2978668);
- *GLRX*: SNP -2763 A/G (rs6556885);
- *TXN*: SNP -224 T/A (rs2301242);
- *TXNIP*: SNP +402 T/C (rs7211);
- *TXNRD2*: SNP -192 G/A (rs3788319);
- *TKT*: SNPs -3787 T/G (rs7637934) e -1410 T/C (rs11130365).

3 MÉTODOS

3.1 Escolha dos SNPs

Os SNPs foram selecionados a partir de um banco de dados de acesso livre (<http://variome.kobic.re.kr/SNPatPromoter/>) que descreve polimorfismos presentes na região promotora de inúmeros genes. As frequências dos SNPs foram checadas nos bancos de dados de SNPs da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e no *Gene Cards* (<http://www.genecards.org/>). Esses SNPs se encontram em locais da região promotora aos quais potencialmente se ligam fatores de transcrição, ou em locais muito próximos a eles, o que aumenta a probabilidade desses polimorfismos apresentarem uma repercussão funcional. Todos os fatores de transcrição que se ligam às regiões que serão estudadas são expressos no tecido renal. Não há publicações de estudos que tenham avaliado a associação desses SNPs com a susceptibilidade ao DM e suas complicações.

3.2 Casuística e protocolo clínico

Um total de 443 pacientes portadores de DM1 foi estudado com mais de 10 anos de diagnóstico e controle glicêmico inadequado, ou seja, com HbA1c > 8% em algum período da vida, acompanhados no 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; do Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual de São Paulo (Iamsp) e do Ambulatório de Diabetes da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) no período entre outubro de 2004 e outubro de 2011.

O DM1 foi aqui definido como deficiência absoluta de secreção de insulina devido a destruição auto-imune das células β pancreáticas e presença de auto-anticorpos, tais como anticorpo anti-insulina, anti-descarboxilase do ácido glutâmico (GAD_{65}), e anti-tirosinas fosfatases IA-2 e IA-2 β ⁽⁵⁸⁾.

A frequência desses polimorfismos também foi avaliada em uma população de 100 indivíduos controles não diabéticos coletados no Serviço de Endocrinologia do Hospital do Servidor Público Estadual (HSPE), apenas para que se avalie se algum desses SNPs pode conferir susceptibilidade ao desenvolvimento de DM1. A utilização do DNA genômico dos portadores e não portadores de DM1 foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos (CAPPesq) do HCFMUSP (ANEXOS B e C).

Para o estudo do SNP no gene *TXNIP*, foram avaliados 626 controles não diabéticos e 705 portadores de DM1.

Os seguintes dados clínicos foram coletados para os pacientes portadores de diabetes: idade atual, idade ao diagnóstico, etnia auto-referida, tempo de diagnóstico, controle glicêmico atual e progresso, história de complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e outras comorbidades como HAS - pressão arterial maior que 140 x 90 mmHg

em, pelo menos, três medidas em posição sentada, ou uso de medicação antihipertensiva -, tabagismo e uso de hipolipemiante.

Também foi registrada a utilização de inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA), de inibidores do receptor da angiotensina II (BRA) e de drogas hipolipemiantes (estatinas e fibratos). Os dados do exame físico registrados foram: peso, estatura e pressão arterial.

Os seguintes exames complementares foram avaliados: HbA1c, colesterol total e frações, triglicérides, creatinina sérica e dosagem da excreção de albumina urinária (EAU) (pelo menos duas medidas em um período de seis meses).

A EAU foi mensurada em amostras de urina de 24 horas por imunoturbidimetria ou em amostra de urina isolada por nefelometria. As dosagens do colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) e triglicérides (TG) foram realizadas pelos respectivos métodos enzimáticos (colorimétrico automatizado). As concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram calculadas pelo uso da fórmula de Friedewald ou medidas diretamente (método cinético automatizado) na vigência de hipertrigliceridemia. As concentrações de creatinina sérica foram medidas pelo método cinético automatizado. A partir de 2003, a HbA1C foi mensurada pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) certificada pela NGSP-EUA (*National Glyco Hemoglobin Standardization Program*). Os exames anteriores a 2003 foram realizados pelo método de imunoturbidimetria (Roche Diagnóstica), também certificado

pela NGSP, e os valores da HbA1C foram normalizados para o valor de referência de 6% atualmente utilizado.

Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A) foram colhidos 10,0 mL de sangue periférico de cada um dos pacientes para extração de DNA genômico de leucócitos.

Dos voluntários controles não diabéticos foram coletados dados como idade atual, presença de HAS, tabagismo e hipotireoidismo primário, história familiar de hipertensão, dislipidemia, DM tipo 1 e 2. Após a assinatura do TCLE, foram colhidos 5,0 mL de sangue periférico de cada um dos voluntários para extração de DNA genômico de leucócitos.

3.3 Definição das complicações renais

Para análise da associação entre os polimorfismos selecionados e as complicações renais, os pacientes foram divididos em três grupos, de acordo com a presença ou não de cada uma das complicações, conforme descrito a seguir.

Os pacientes com acometimento renal por outras doenças que não o DM, tais como portadores de hepatite por vírus C, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças auto-imunes foram excluídos.

3.3.1 Nefropatia diabética franca

Foram classificados como portadores de **ND franca** aqueles pacientes que apresentavam:

1. Macroalbuminúria, definida como uma taxa de EAU >300 mg/g de creatinina ou $\geq 200 \mu\text{g}/\text{min}$ em, pelo menos, duas medidas;
2. Proteinúria, definida com uma perda protéica > 500 mg/24 h;
3. Terapia de reposição renal (qualquer modalidade de diálise), desde que o paciente apresentasse macroalbuminúria ou proteinúria;
4. Transplante renal ou transplante duplo rim-pâncreas, desde que o paciente apresentasse macroalbuminúria ou proteinúria prévia ao transplante.

Os pacientes classificados como **não portadores de ND franca** apresentavam:

1. Normoalbuminúria persistente, definida como uma taxa de EAU < 30 mg/g de creatinina ou < 20 $\mu\text{g}/\text{min}$;

3.3.2 Ritmo de filtração glomerular estimado

O RFG estimado (RFG_e) foi obtido pelo uso da fórmula do *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD)⁽⁵⁹⁾ e os pacientes foram divididos em dois grupos: (1) pacientes com **RFG_e $\geq 60 \text{ mL}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$** e

(2) pacientes com **RFGe < 60 mL/min/1,73 m²** ou com história de transplante isolado de rim ou de transplante duplo rim-pâncreas.

Para os pacientes que apresentaram RFGe entre 50 e 70 mL/min/1,73 m² foi feita mediana de três medidas próximas para assegurar a classificação no grupo \geq ou $<$ 60 mL/min/1,73 m².

Os pacientes que apresentaram RFGe $<$ 60 mL/min/1,73 m² e normoalbuminúria foram excluídos caso não apresentassem retinopatia diabética, para diminuir a possibilidade de doença renal de etiologia não diabética.

3.3.3 Nefropatia diabética estabelecida

Para essa classificação os pacientes foram divididos em dois grupos: (1) EAU normal ou microalbuminúria e com RFGe \geq 60 mL/min, considerados aqui como **sem ND estabelecida**; (2) pacientes com macroalbuminúria a proteinúria ou RFGe $<$ 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 portadores de **ND estabelecida**⁽⁶⁰⁾.

3.4 Extração do DNA

Em um tubo graduado, foram acrescentados 15 mL de Tris EDTA (TE) para cada 5 mL de sangue total. O tubo foi homogeneizado manualmente e 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 feita nova centrifugação e o sobrenadante desprezado. Esta lavagem repetiu-se quatro vezes, até o *pellet* adquirir coloração esbranquiçada. Em seguida, foram adicionados ao *pellet*:

- 3 mL de tampão A;
- 200 μ L de sódio dodecil sulfato (SDS) 10%;
- 100 μ L de Proteinase K.

Esta solução foi incubada por 12 horas em estufa a 37° C e, após este 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.

Foram adicionados 10 mL de etanol absoluto gelado, com homogeneização 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 ressuspendido em 50 – 200 μ L H₂O miliQ estéril e incubado a 37° C durante 15 min. O DNA assim obtido foi armazenado a temperatura de –20°C em concentração de 100

ng/ μ L. Para execução da reação em cadeia da polimerase (PCR) as amostras foram rediluídas em placas de 96 poços na concentração de 10 ng/ μ L e armazenadas a -20°C . A concentração das amostras foi confirmada com uso do espectrofotômetro *NanoDrop* (Thermo Scientific).

3.5 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

O equipamento de PCR em tempo real, *StepOnePlus* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), que permite o processamento de DNA em placas de 96 poços, foi utilizado. Este ensaio de genotipagem detecta as variantes alélicas de um SNP, sem quantificar o alvo.

Para preparação da PCR, foram utilizados em cada amostra: 5 μ L de *TaqMan Genotyping Master Mix* (conjunto de reagentes otimizados para genotipagem de SNPs, incluindo AmpliTaq Gold DNA polimerase, dNTPs sem dUTP, referência passiva e *mix* de componentes otimizados); 3,5 μ L de água MilliQ autoclavada; 1 μ L de amostra DNA em concentração 10 ng/ μ L; 0,25 μ L de tampão TE; e 0,25 μ L de *TaqMan SNP Genotyping Assays* (contém: duas sequências de *primers* específicos, para amplificar o polimorfismo de interesse; e duas sondas alelo-específicas TaqMan MGB, para detectar os alelos do polimorfismo de interesse) (Applied Biosystems Califórnia, EUA). A presença de duas sondas em cada reação permite a genotipagem das duas possíveis variantes do SNP: a sonda do alelo 1 é

marcada com o *Reporter dye* VIC, e a sonda do alelo 2 é marcada com o *Reporter dye* FAM, que apresentam fluorescências diferentes durante a reação. O sinal de fluorescência gerado pela amplificação de PCR indica quais alelos estão presentes na amostra.

Durante a reação, primeiramente a sonda contendo os fluoróforos se liga a fita de DNA, essas fluorescências são chamadas *Quencher* (molécula inibidora) e *Reporter* (molécula que emitirá a fluorescência). Em seguida, o *primer* se liga à fita de DNA e a enzima Taq DNA polimerase começa a estendê-lo, adicionando os nucleotídeos. Neste momento o *software* começa a registrar a reação. Quando a DNA polimerase encontra a sonda, a *Reporter* e a *Quencher* são separadas e a emissão de fluorescência do *Reporter* não será mais absorvida pelo *Quencher*, resultando em um aumento de fluorescência que será detectada.

O software *StepOne* normaliza a fluorescência do *Reporter dye* com o *dye* da referência passiva em cada amostra. Em seguida, o *software* coloca as intensidades normalizadas (R_n) do *dye* em um Gráfico de Discriminação Alélica, que contrasta as intensidades do *Reporter dye* das sondas alelo-específicas. De acordo com a posição nesse gráfico, gera-se o resultado do genótipo de cada amostra.

3.6 Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição

A frequência de ocorrência dos genótipos do SNP *GSR -247 A/G* não era conhecida na literatura. Sendo assim, foi feita genotipagem piloto de 60 pacientes portadores de DM pela técnica de polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) para verificar a frequência desse SNP em nossa população.

A sequência de pares de base presente nas proximidades desse SNP foi obtida no banco de dados de SNPs do NCBI e a pesquisa de sítios de clivagem por enzimas de restrição foi realizada pelo programa de livre acesso *NEB cutter*. O local de troca de base do polimorfismo foi identificado como sítio de clivagem da enzima *Hinfl*.

Para execução do PCR foram desenhados os seguintes *primers forward* (F) e *reverse* (R) (Prodimol Biotecnologia).

Primers: 5' atcgctgcttgagcacagta 3' (F)

5' ggagcctgaggggttct 3' (R)

Aos *primers* F e R (10 uM) foram adicionados 32,8 µL de água MilliQ, 1 µL de dNTPs (0,2 mM), 5 µL de tampão, 5 µL de betaína (0,5 M), 2 µL de amostra de DNA (100 ng/µL) e 1 unidade de TaqPolimerase (GE Healthcare).

Na reação de RT-PCR foram feitos 35 ciclos com temperatura de *annealing* de 59°C. Para digestão enzimática, uma unidade de enzima *HinfI* foi incubada a 37°C por 24 horas e o produto da reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 3%.

A frequência encontrada no estudo piloto foi de 100% dos indivíduos homozigotos para o alelo ancestral A. A partir desses resultados, não foi dado prosseguimento ao estudo desse SNP no restante da casuística.

A frequência de ocorrência do SNP *TXNRD2* -192 G/A também não estava bem estabelecida na literatura. Sendo assim, foi feita genotipagem piloto de 60 pacientes portadores de DM pela técnica de RFLP.

Os *primers* desenhados foram:

Primers: 5' gacctagggtggaacactgg 3'(F)

5' taccacaccctcaccaggtc 3' (R)

A frequência encontrada no estudo piloto foi de aproximadamente 77% para o alelo polimórfico e 22% para o alelo ancestral, semelhante aos dados encontrados em algumas populações no banco de dados do NCBI. A partir desses resultados, procedeu-se à genotipagem da casuística completa pelo sistema TaqMan.

3.7 Análise estatística

As variáveis clínicas 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 dentre os avaliados para a variável. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi determinado usando-se a frequência dos alelos com o teste do qui-quadrado (χ^2) de Pearson. O programa JMP 8.0 (JMP SAS Institute Inc) 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 χ^2 de Pearson também foi utilizado para avaliar a frequência dos polimorfismos entre os pacientes portadores de diabetes e os controles não diabéticos, as diferenças nas variáveis categóricas relativas às características clínicas iniciais entre os dois grupos de portadores de diabetes estudados, bem como a associação da presença dos polimorfismos com os desfechos renais avaliados.

A magnitude do risco conferido por cada variável significativamente diferente foi estimada usando *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%. A OR ajustada foi estimada por regressão logística para possíveis fatores de confusão como: sexo, idade ao diagnóstico, tempo de DM, hipertensão arterial, concentrações plasmáticas de triglicérides e colesterol total e HbA1C. O nível de significância adotado (p) foi de 0,05 e

bicaudal e o poder do estudo foi $> 80\%$ para detectar associações de SNPs no modelo dominante com frequências do alelo mais raro de 14% e um risco relativo para o genótipo de $1,7$. As análises também foram realizadas no modelo recessivo.

4 RESULTADOS

4.1 Análise das características clínicas dos pacientes

4.1.1 Análise de acordo com a presença ou ausência de ND estabelecida

Para esta avaliação foram considerados 443 pacientes portadores de DM1 divididos em dois grupos: com ou sem ND estabelecida. As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes estão descritas na Tabela 1.

Dentre os pacientes sem ND estabelecida, havia um maior número de pacientes do sexo feminino. Os pacientes com ND estabelecida eram mais velhos e com maior tempo de DM1 (36 *versus* 33 anos e 23 *versus* 20 anos, respectivamente); apresentaram maior frequência de HAS (64,2% *versus* 36,4%), de uso de hipolipemiantes e de anti-hipertensivos (25,7% *versus* 16,7% e 38% *versus* 21,3%, respectivamente), maiores concentrações plasmáticas de colesterol total e de LDL (179 mg/dL *versus* 173 mg/dL e 99 mg/dL *versus* 94 mg/dL), maior trigliceridemia (95 mg/dL *versus* 69 mg/dL) e maior incidência de retinopatia e de retinopatia proliferativa (84,8% *versus* 52,1% e 57,3 *versus* 20,7%) que os pacientes sem ND estabelecida.

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos portadores de DM 1 de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND) estabelecida

Variáveis	Sem ND estabelecida n=268	Com ND estabelecida n=175	Valor de p
Sexo (feminino/masculino)	163/105	88/87	0,03
Etnia (caucasóide/negróide/outros)	237/21/7	161/8/6	NS
Idade (anos)	33 (25-42)	36 (30-45)	0,0003
Idade ao diagnóstico (anos)	12 (6-18)	13 (9-20)	NS
Duração do diabetes (anos)	20 (16-25)	23 (17-29)	0,002
Hipertensão arterial (%)	36,4	64,2	<0,001
Uso de hipolipemiante (%)	16,7	25,7	0,02
Uso de anti-hipertensivo (%)	21,3	38,8	<0,001
HbA1C (%)	8,4 (7,4-9,8)	8,5 (7,4-9,9)	NS
Colesterol total (mg/dL)	173,0 (149-197)	179,0 (150-210)	0,02
HDL colesterol (mg/dL)	58,0 (47-69)	53,0 (43-65)	NS
LDL colesterol (mg/dL)	94,0 (77-112)	99,0 (78-128)	0,01
Triglicérides (mg/dL)	69 (53-109)	95,0 (70-136)	<0,001
IMC	23,3 (21,3-25,8)	23,1 (21,2-25,2)	NS
Retinopatia (%)	52,1	84,8	<0,0001
Retinopatia proliferativa (%)	20,7	57,3	<0,0001

Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartilico para variáveis contínuas e número de casos e porcentagem para variáveis categóricas.

4.1.2 Análise de acordo com o RFGc

Para esta avaliação, foram considerados 433 pacientes com DM divididos em dois grupos, de acordo com o RFGc. As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos portadores de DM1 de acordo com o RFGc estão descritas na Tabela 2.

Os pacientes portadores RFG_e < 60 mL/min/1,73 m² eram significativamente mais velhos (38 *versus* 33 anos) e possuíam DM1 há mais tempo (23 *versus* 20 anos) que aqueles com RFG_e ≥ 60 mL/min/1,73 m².

As frequências de HAS e de uso de anti-hipertensivos foram significativamente mais altas (65,9% *versus* 38,7% e 40,5% *versus* 23,3%, respectivamente), assim como as concentrações plasmáticas de triglicérides (96 mg/dL *versus* 71 mg/dL), colesterol (179 mg/dL *versus* 173 mg/dL), LDL (103 mg/dL *versus* 93 mg/dL) e a frequência de retinopatia e retinopatia proliferativa (86,4% *versus* 55,5% e 62,2%, *versus* 22,6% respectivamente) no grupo com RFG_e < 60 mL/min/1,73 m². Já o HDL colesterol foi mais alto (58 mg/dL *versus* 52 mg/dL) no grupo de pacientes com RFG_e ≥ 60 mL/min/1,73 m².

Tabela 2. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos portadores de DM 1 de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado (RFGe).

Variáveis	RFGe ≥ 60 mL/min/1,73 m ² n=242	RFGe < 60 mL/min/1,73 m ² n=191	Valor de <i>p</i>
Sexo (feminino/masculino)	173/122	69/69	NS
Etnia (caucasóide/negróide/outros)	266/22/7	125/7/6	NS
Idade (anos)	33 (26-43)	38 (31-45,2)	0,0001
Idade ao diagnóstico (anos)	12 (7-19)	13 (9-20)	NS
Duração do diabetes (anos)	20 (16-25)	23 (18-31)	0,0002
Hipertensão arterial (%)	38,7	65,9	<0,0001
Uso de hipolipemiante (%)	18,5	25,3	NS
Uso de anti-hipertensivo (%)	23,3	40,5	0,0004
HbA1C (%)	8,3 (7,4-9,9)	8,4 (7,5-9,8)	NS
Colesterol total(mg/dL)	173 (150-199)	179 (150-211)	0,02
HDL colesterol (mg/dL)	58 (49-69)	52 (43-63)	0,001
LDL colesterol (mg/dL)	93 (77-114)	103 (78-129)	0,001
Triglicérides (mg/dL)	71 (53-109)	96 (72-137)	<0,0001
IMC	23,3 (21,3-25,7)	23 (21,2-25,2)	NS
Retinopatia (%)	55,5	86,4	<0,0001
Retinopatia proliferativa (%)	22,6	62,2	<0,0001

Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartilício para variáveis contínuas e número de casos e porcentagem para variáveis categóricas.

4.1.3 Análise de acordo com a presença ou ausência de ND franca

Nesta avaliação foram considerados 331 pacientes com DM divididos em sem ND franca e com ND franca. As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes estão descritas na Tabela 3.

Dentre os pacientes sem ND franca, havia um maior número de pacientes do sexo feminino. A frequência de hipertensão e as concentrações plasmáticas de triglicérides foram significativamente mais altas nos pacientes

com ND franca (43,6% *versus* 37,9% e 96 mg/dL *versus* 69 mg/dL, respectivamente). As concentrações plasmáticas de colesterol e de LDL também foram mais altas nos pacientes com ND franca (180 mg/dL *versus* 173 mg/dL e 98 *versus* 95 mg/dL, respectivamente), comparados aos pacientes sem ND franca. Além disso, as frequências de uso de anti-hipertensivos e hipolipemiantes também foram maiores nos pacientes com ND franca (41,9% *versus* 21,1% e 33,6% *versus* 22,6%, respectivamente), bem como a frequência de retinopatia e de retinopatia proliferativa (89,9% *versus* 52% e 61,1% *versus* 18,6%, respectivamente).

Tabela 3. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos portadores DM 1 de acordo com a ausência ou presença de nefropatia diabética (ND) franca

Variáveis	Sem ND franca n=221	Com ND franca n=110	Valor de p
Sexo (feminino/masculino)	137/84	54/56	0,03
Etnia (caucasóide/negróide/outros)	193/14/11	104/6	NS
Idade (anos)	35 (26-44)	33 (29/41)	NS
Idade ao diagnóstico (anos)	12 (6-20)	13 (8-19)	NS
Duração do diabetes (anos)	21 (16-27)	20 (17-24)	NS
Hipertensão arterial (%)	37,9	43,6	0,0001
Uso de hipolipemiante (%)	22,6	33,6	0,0002
Uso de anti-hipertensivo (%)	42 (21,1)	44 (41,9)	0,0001
HbA1C (%)	8,4 (7,4-9,6)	8,5 (7,2-10)	NS
Colesterol total (mg/dL)	173 (150-196)	180 (151-213)	0,001
HDL colesterol (mg/dL)	58 (48-66)	56 (46-69)	NS
LDL colesterol (mg/dL)	95 (79-113)	98 (73-129)	0,01
Triglicérides (mg/dL)	69 (53-99)	96 (70-155)	<0,0001
IMC	23,6 (21,3-25,8)	23 (21,2-24,9)	NS
Retinopatia (%)	52	89,9	<0,0001
Retinopatia proliferativa (%)	18,6	61,1	<0,0001

Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartilico para variáveis contínuas e número de casos e porcentagem para variáveis categóricas.

4.2 Análise das associações entre os SNPs e a doença renal

4.2.1 Gene GPX4

SNP -2030T/G – rs34071297

A genotipagem das amostras para o SNP *GPX4* -2030 T/G mostrou que todos os indivíduos de nossa casuística eram heterozigotos. Quando um ensaio resulta em um único genótipo, o equipamento de PCR em tempo real não é capaz de identificar o genótipo encontrado, pois este ensaio dá-se

pela diferença dos sinais de fluorescência gerada pela amplificação de, pelo menos, dois alelos diferentes (Figuras 5A e 5B). Sendo assim, é necessário que exista pelo menos um controle positivo nas amostras, o que não ocorreu na casuística analisada. No entanto, como os alelos ancestral e polimórfico são marcados com sondas diferentes é possível acompanhar a curva de amplificação de cada alelo em cada amostra, o que tornou possível aferir que em nossa população o único genótipo encontrado é o heterozigoto, já que houve amplificação dos dois alelos. Diante desse resultado, esse SNP não pôde ser analisado.

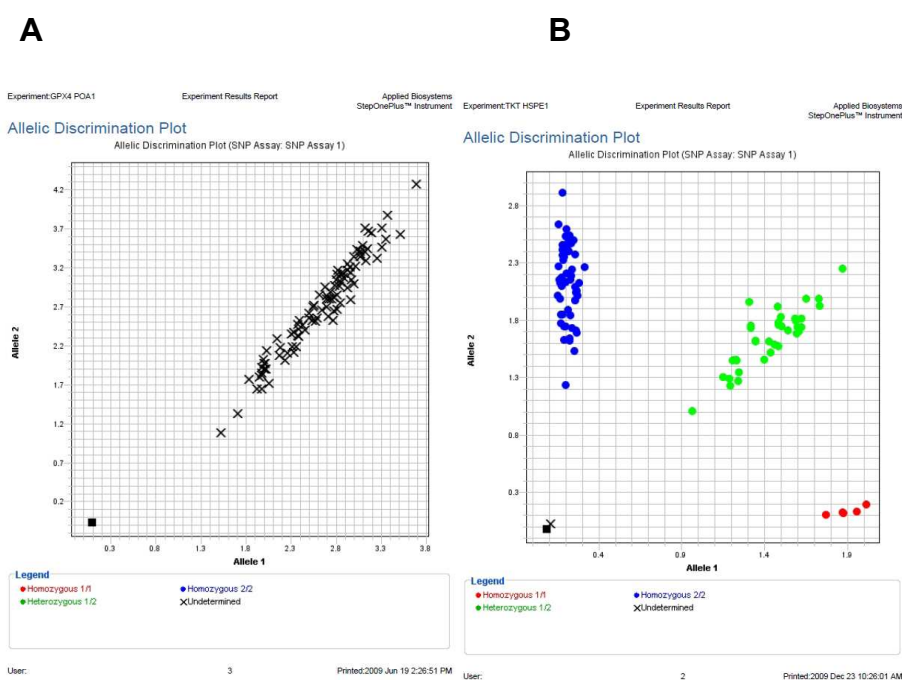


Figura 5. (A): Resultado de ensaio de genotipagem com presença de apenas um genótipo; (B): Resultado de ensaio de genotipagem com presença de dois ou mais genótipos

SNP +718C/T – rs713041

O SNP 718C/T encontra-se na região 3'UTR e sua funcionalidade já foi demonstrada^(30, 31). A distribuição dos genótipos na população estudada foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não houve diferença significativa na frequência dos genótipos desse SNP entre a população diabética e a população controle não diabética (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência dos genótipos do SNP +718C/T no gene GPX4 em portadores de DM 1 e em indivíduos controle não diabéticos.

Genótipos	Portadores de diabetes tipo 1 (n =461)	Controles não diabéticos (n=100)
GPX4/CC (%)	30,1%	34%
GPX4/CT (%)	51,8%	52,3%
GPX4/TT (%)	18%	13,7%

Análise de acordo com o RFGe

A análise da associação do genótipo com o RFGe não evidenciou diferenças significantes entre os grupos com RFGe \geq ou $<$ que 60 mL/min/1,73 m² em nenhum dos modelos avaliados.

Análise de acordo com presença ou ausência de ND estabelecida

A análise de associação do genótipo com a ND estabelecida não demonstrou diferenças significantes entre os grupos com e sem ND estabelecida em nenhum dos modelos avaliados. No entanto, quando foi feita a análise no modelo dominante da casuística separada por sexo (Tabela 5) encontrou-se uma frequência maior do alelo polimórfico T nos

pacientes do sexo masculino sem ND estabelecida (OR=0,48, IC 95% 0,26-0,90, $p= 0,028$).

Tabela 5. Distribuição da frequência dos genótipos do SNP *GPX4* +718C/T no sexo masculino, de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND) estabelecida.

	Com ND estabelecida	Sem ND estabelecida	Valor de p
Genótipo CT+TT	51/85 (60%)	80/105 (76,1%)	0,028

ND - nefropatia diabética

A análise de regressão logística realizada para obtenção da OR ajustada para os possíveis fatores de confusão demonstrou que o alelo polimórfico T permaneceu conferindo proteção contra a ND estabelecida nos pacientes do sexo masculino (OR=0,41; IC 95% 0,19-0,83, $p= 0,0146$) (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de regressão logística com a nefropatia diabética estabelecida como variável dependente em pacientes portadores de DM1 do sexo masculino.

Variável	OR	IC (95%)	Valor de p
Tempo DM	2,13	1,06-4,37	0,03
Idade ao diagnóstico	1,57	0,78-3,18	NS
Hipertensão arterial	1,4	0,70-2,81	NS
Triglicérides	2,1	1,03-4,51	0,04
Colesterol total	1,26	0,64-2,48	NS
HbA1c	1,44	0,73-2,86	NS
GPX4 (CT+TT)	0,41	0,19-0,83	0,014

OR – *odds ratio*; IC – intervalo de confiança

Análise de acordo com presença ou ausência de ND franca

A análise de associação do genótipo com a ND franca não demonstrou diferenças significantes entre os grupos com e sem ND franca em nenhum dos modelos avaliados. Quando foi feita a análise no modelo dominante da casuística separada por sexo (Tabela 7) encontrou-se uma frequência maior do alelo polimórfico T nos pacientes do sexo masculino sem ND franca (OR=0,46, IC 95% 0,23-0,95, p= 0,047).

Tabela 7. Distribuição da frequência dos genótipos do SNP *GPX4* +718C/T no sexo masculino, de acordo com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND) franca

	Com ND franca	Sem ND franca	Valor de p
Genótipo CT+TT	30/56 (53,7%)	59/83 (71,08%)	0,047

ND - nefropatia diabética

A análise de regressão logística realizada para obtenção da OR ajustada para os possíveis fatores de confusão demonstrou que o alelo polimórfico T permaneceu conferindo proteção contra a ND franca nos pacientes do sexo masculino (OR=0,37; IC 95% 0,15-0,85; p= 0,021) (Tabela 8).

Tabela 8. Análise de regressão logística com a nefropatia diabética franca como variável dependente em portadores de DM1 do sexo masculino

Variável	OR	IC (95%)	Valor de p
Tempo DM	1,13	0,47 – 2,72	NS
Idade ao diagnóstico	0,95	0,38 – 2,29	NS
Hipertensão arterial	2,82	1,18 – 7,02	0,02
Triglicérides	3,46	1,38 – 9,03	0,009
Colesterol total	1,53	0,65 – 3,59	NS
HbA1c	1,44	0,62 – 3,37	NS
GPX4 (CT+TT)	0,37	0,15 – 0,85	0,021

OR – *odds ratio*; IC – intervalo de confiança;

Análise de acordo com o genótipo

A presença de HAS e a maior trigliceridemia podem ser tanto fatores de risco para o comprometimento renal como podem ocorrer secundariamente a ele. Por essa razão, uma análise a partir do genótipo foi realizada para evidenciar que características clínicas e laboratoriais diferem entre os grupos com genótipo CC e CT+TT.

A Tabela 9 mostra que as únicas variáveis que diferiram entre os pacientes com genótipo CC *versus* CT+TT foram as frequências de ND estabelecida e ND franca.

Tabela 9. Análise das características clínicas e laboratoriais dos pacientes do sexo masculino de acordo com o genótipo do SNP *GPX4 +718C/T*

Variável	CC (n=132)	CT+TT (n=307)	Valor de p
Idade atual (anos)	36 (28-42)	35,5 (29-44)	0,82
Idade ao diagnóstico (anos)	15 (8-22)	13 (7-20)	0,58
Tempo DM (anos)	21 (17-26)	21 (17-26)	0,63
HbA1c (%)	8,75 (7,6-9,9)	8,25 (7,1-9,9)	0,21
Colesterol total (mg/dL)	168 (148,5-195,7)	169 (147,2-198,2)	0,37
HDL (mg/dL)	53 (44,5-63,5)	50,5 (44-61)	0,25
LDL (mg/dL)	90 (78-122)	95,5 (76-120)	0,57
Triglicérides (mg/dL)	80 (51-123)	89 (60,2-118,7)	0,82
Uso de hipolipemiante (%)	14,2	18,5	0,54
Uso de anti-hipertensivo (%)	23,8	26,6	0,72
Hipertensão arterial (%)	50	47,3	0,75
Nefropatia diabética franca (%)	52	33,7	0,047
RFGe<60mL/min/1,73 m ²	42,3	31,8	0,18
Nefropatia estabelecida (%)	Diabética 56,6	38,9	0,028

4.2.2 Gene GSS – rs10427424

Como o estudo por PCR em tempo real demonstrou frequência de 100% para o genótipo GG do SNP -3310 G/C, não foi possível realizar o estudo de associação com a doença renal.

4.2.3 Gene GSR – rs2978668

A genotipagem piloto da casuística das populações diabética e não diabética para o SNP GSR -247 A/G pela técnica de RFLP revelou apenas indivíduos homozigotos para o alelo ancestral A, o que impossibilitou o estudo de associação deste SNP com a doença renal.

4.2.4 Gene TXN – rs2301242

A distribuição dos genótipos do SNP *TXN* - 224 T/A foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada. Não houve diferença significativa na frequência dos genótipos desse SNP entre a população diabética e a população controle não diabética (Tabela 10)

Tabela 10. Frequência dos genótipos do SNP *TXN* -224 T/A em portadores de DM1 e em indivíduos controle não diabéticos.

Genótipos	Portadores de DM1 (n =451)	Controles não diabéticos (n=100)
<i>TXN</i> /TT (%)	43,2%	43%
<i>TXN</i> /TA (%)	42,1%	45%
<i>TXN</i> /AA (%)	14,6%	12%

Análise de acordo com o RFG_e

A análise de associação do genótipo com o RFG_e não evidenciou diferenças significantes entre os grupos com RFG_e ≥ ou < 60 mL/min/1,73 m² em nenhum dos modelos avaliados.

Análise de acordo com a presença ou ausência de ND estabelecida

A análise de associação do genótipo com a ND estabelecida não demonstrou diferenças significantes entre os grupos com e sem ND estabelecida em nenhum dos modelos avaliados.

Análise de acordo com a presença ou ausência de ND franca

A análise de associação do genótipo com a ND franca não demonstrou diferenças significantes entre os grupos com e sem ND franca em nenhum dos modelos avaliados na casuística total. Quando foi feita a análise da casuística separada por sexo no modelo recessivo, observou-se uma tendência de associação entre a maior frequência do genótipo AA nas mulheres com ND franca (OR=2,23, IC 95% 1,01-4,88, p= 0,054) (Tabela 11), porém, o poder estatístico dessa análise é muito baixo pelo fato da casuística ser muito pequena. Apesar disso, análise de regressão logística demonstrou que o genótipo AA permaneceu conferindo risco para a ND franca nas pacientes do sexo feminino (OR= 4,06; IC 95% 1,59-10,6, p= 0,0035) (Tabela 12).

Tabela 11. Distribuição da frequência dos genótipos do SNP *TXN -224 T/A* no sexo feminino de acordo com a ausência ou presença de nefropatia diabética (ND) franca

	Com ND franca	Sem ND franca	Valor de p
Genótipo AA	14/51 (27,4 %)	19/130 (14,6%)	0,054

ND - nefropatia diabética

Tabela 12. Análise de regressão logística com a nefropatia diabética franca como variável dependente em portadoras de DM1 do sexo feminino

Variável	OR	IC (95%)	Valor de p
Tempo DM	0,64	0,28-1,42	NS
Idade ao diagnóstico	0,97	0,43-2,17	NS
Hipertensão arterial	4,23	1,93-9,87	0,0005
Triglicérides	2,28	0,92-5,69	NS
Colesterol total	0,93	0,40-2,16	NS
HbA1c	0,71	0,31-1,57	NS
TXN (Genótipo AA)	4,06	1,59-10,66	0,0035

OR – odds ratio; IC – intervalo de confiança

Análise de acordo com o genótipo

A análise das características clínicas e laboratoriais de acordo com o genótipo demonstrou a frequência de ND franca como a única variável a apresentar um valor de p limítrofe entre os genótipos TT+TA *versus* AA (Tabela 13).

Tabela 13. Análise das características clínicas e laboratoriais das pacientes do sexo feminino de acordo com o genótipo do SNP TXN -224 T/A

Variável	TT+TA (n=270)	AA (n=51)	Valor de p
Idade Atual (anos)	33 (26-43)	32 (28-44)	0,92
Idade ao diagnóstico (anos)	12 (7-18)	12,5 (10,7-19,2)	0,43
Tempo DM (anos)	20 (16-26,2)	20 (16-26)	0,62
HbA1c (%)	8,4 (7,5-9,5)	8,8 (7-10)	0,66
Colesterol total (mg/dL)	182 (153-207)	172 (152,2-206,5)	0,30
HDL (mg/dL)	62 (49-73)	59 (47-72)	0,45
LDL (mg/dL)	96,4 (79-118)	93,7 (76-119,5)	0,48
Triglicérides (mg/dL)	78,5 (57-116)	82,5 (57,5-134,5)	0,91
Uso de hipolipemiante (%)	22,7	21,05	1
Uso de anti-hipertensivo (%)	27,7	36,8	0,32
HAS (%)	45,7	48,7	0,86
Nefropatia diabética estabelecida (%)	33,1	41,03	0,36
RFG _e <60 mL/min/1,73 m ²	27,8	28,2	1
Nefropatia diabética franca (%)	25	42,4	0,05

4.2.5 Gene TXNRD2 – rs3788319

A distribuição dos genótipos desse SNP na população estudada foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não houve diferença significativa na frequência dos genótipos desse polimorfismo entre a população diabética e a população controle não diabética (Tabela 14).

Tabela 14. Frequência dos genótipos do polimorfismo -192 G/A no gene *TXNRD2* em pacientes com DM 1 e em indivíduos controle não diabéticos

Genótipos	Portadores de DM1 (n =461)	Controles não diabéticos (n=100)
<i>TXNRD2</i> /GG (%)	33%	36,3%
<i>TXNRD2</i> /GA (%)	49%	45,1%
<i>TXNRD2</i> /AA (%)	18%	18,7%

Análise de acordo com o RFG_e

A análise de associação entre o SNP *TXNRD2* -192 G/A e o RFG_e não revelou diferenças significantes entre os grupos com RFG_e ≥ ou < que 60 mL/min/1,73 m² em nenhum dos modelos avaliados.

Análise de acordo com presença ou ausência de ND estabelecida

A análise de associação entre o SNP *TXNRD2* -192 G/A e a ND estabelecida não evidenciou diferenças significantes entre os grupos com ou sem ND estabelecida em nenhum dos modelos avaliados.

Análise de acordo com ND franca

Não houve diferença significativa na frequência dos genótipos entre pacientes com e sem ND franca nos modelos avaliados.

4.2.6 Gene *TXNIP* – rs7211

A distribuição dos genótipos do SNP +402 T/C na região 3'UTR do gene *TXNIP* não foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg na

população de portadores de DM1, apenas na população de indivíduos controles. A frequência do genótipo ancestral TT foi significativamente maior nos portadores de DM1 em relação aos controles. Sendo assim, as casuísticas tanto dos pacientes DM1 como dos controles foram aumentadas para verificar se esse SNP poderia conferir risco para o desenvolvimento do DM1. Com o aumento da casuística, a diferença entre as populações controle e de portadores de DM1 permaneceu significativamente diferente ($p < 0,0001$) (Tabela 15).

Tabela 15. Frequência dos genótipos do SNP +402 T/C do gene *TXNIP* em portadores de DM1 e em indivíduos controle não diabéticos

Genótipos	Portadores de DM 1 (n =705)		Controles não diabéticos (n=626)	
<i>TXNIP</i> /TT (%)	8,9%	Mulheres – 11%	4%	Mulheres – 3,9%
		Homens – 6,7%		Homens – 4,5%
<i>TXNIP</i> /TC (%)	24,1%	Mulheres – 23%	27%	Mulheres – 27,4%
		Homens – 24,7%		Homens – 25,9%
<i>TXNIP</i> /CC (%)	67%	Mulheres – 66%	69%	Mulheres – 68,7%
		Homens – 68,7%		Homens – 69,5%

Análise de acordo com o RFGe

A análise de associação entre o SNP *TXNIP* +402 T/C e o RFGe não revelou diferenças significantes entre os grupos com RFGe \geq ou $<$ que 60 mL/min/1,73 m² em nenhum dos modelos avaliados na população total. No entanto, quando a casuística foi separada por sexo, o genótipo CC foi mais frequente nos indivíduos com RFGe \geq 60 mL/min/1,73 m² (OR=0,46, IC 95%

0,24-0,88, $p= 0,029$) (Tabela 16), porém, o poder estatístico dessa análise é muito baixo pelo fato da casuística ser muito pequena.

Tabela 16. Distribuição da frequência dos genótipos do SNP *TXNIP* +402 T/C no sexo masculino de acordo com o RFG_e \geq ou $<$ que 60 mL/min/1,73 m²

	RFG _e \geq 60 mL/min/1,73 m ²	RFG _e $<$ 60 mL/min/1,73 m ²	Valor de p
Genótipo CC	81/111 (79,9%)	35/63 (55,5%)	0,029

Quando foi feita a análise de regressão logística para os fatores de confusão, o SNP perdeu significância (OR= 0,51; IC 95% 0,24-1,04, $p= 0,1$) (Tabela 17).

Tabela 17. Análise de regressão logística com RFG_e \geq ou $<$ que 60 mL/min/1,73 m² como variável dependente em portadores de DM1 no sexo masculino

Variável	OR	IC (95%)	Valor de p
Tempo DM	1,87	0,89-4,03	NS
Idade ao diagnóstico	1,62	0,77-3,46	NS
Hipertensão arterial	1,34	0,64-2,81	NS
Triglicérides	2,28	1,05-4,95	0,03
Colesterol total	1,32	0,64-2,69	NS
HbA1c	1,26	0,61-2,64	NS
<i>TXNIP</i> (Genótipo CC)	0,51	0,24-1,04	NS

OR – *odds ratio*; IC – intervalo de confiança

Análise de acordo com presença ou ausência de ND estabelecida

A análise de associação entre o SNP *TXNIP* +402 T/C e a ND estabelecida revelou que o genótipo CC foi mais frequente nos indivíduos sem ND estabelecida (OR=0,59 , IC 95% 0,39-0,90, $p= 0,0147$) (Tabela 18).

Tabela 18. Distribuição da frequência dos genótipos do SNP *TXNIP* +402 T/C de acordo com a presença ou ausência de ND estabelecida

	Sem ND estabelecida	Com ND estabelecida	Valor de p
Genótipo CC	161/233 (69,1%)	93/163 (57%)	0,0147

ND – Nefropatia diabética

No entanto, quando foi feita a análise de regressão logística para os fatores de confusão, o SNP perdeu significância (OR= 0,67; IC 95% 0,42-1,08, $p= 0,1$) (Tabela 19).

Tabela 19. Análise de regressão logística com a nefropatia diabética estabelecida como variável dependente em portadores de DM1

Variável	OR	IC (95%)	Valor de p
Tempo DM	1,36	0,86-2,16	NS
Idade ao diagnóstico	1,52	0,97-2,39	NS
Hipertensão arterial	2,31	1,47-3,64	0,0003
Triglicérides	1,93	1,15-3,25	0,01
Colesterol total	1,11	0,69-1,76	NS
HbA1c	1,06	0,67-1,68	NS
<i>TXNIP</i> (Genótipo CC)	0,67	0,42-1,08	NS

OR – *odds ratio*; IC – intervalo de confiança

Quando a casuística foi separada por sexo, o genótipo CC também foi mais frequente nos indivíduos sem ND estabelecida (OR=0,41, IC 95% 0,21-

0,78, $p=0,006$) (Tabela 20), porém, o poder estatístico dessa análise é muito baixo pelo fato da casuística ser muito pequena. Apesar disso, análise de regressão logística demonstrou que o genótipo CC permaneceu conferindo proteção para a ND estabelecida nas pacientes do sexo masculino (OR=0,45; IC 95% 0,22-0,91, $p=0,002$) (Tabela 21).

Tabela 20. Distribuição da frequência dos genótipos do SNP *TXNIP* +402 T/C de acordo com a presença ou ausência de ND estabelecida no sexo masculino

	Sem ND estabelecida	Com ND estabelecida	Valor de p
Genótipo CC	71/95 (74,7%)	44/80 (55%)	0,006

ND – Nefropatia diabética

Tabela 21. Análise de regressão logística com a nefropatia diabética estabelecida como variável dependente em portadores de DM1 do sexo masculino

Variável	OR	IC (95%)	Valor de p
Tempo DM	1,67	0,81-3,5	NS
Idade ao diagnóstico	1,82	0,89-3,77	NS
Hipertensão arterial	1,45	0,71-2,97	NS
Triglicérides	1,83	0,85-3,98	NS
Colesterol total	1,33	0,66-2,67	NS
HbA1c	1,38	0,68-2,81	NS
<i>TXNIP</i> (Genótipo CC)	0,45	0,22-0,91	0,02

OR – odds ratio; IC – intervalo de confiança

Análise de acordo com ND franca

A análise de associação entre o SNP *TXNIP* +402 T/C e ND franca não revelou diferenças significantes em nenhum dos modelos avaliados na população total. No entanto, quando a casuística foi separada por sexo, o genótipo CC foi mais frequente nos indivíduos sem ND franca (OR=0,42, IC

95% 0,20-0,88, $p= 0,025$) (Tabela 22) porém, o poder estatístico dessa análise é muito baixo pelo fato da casuística ser muito pequena.

Tabela 22. Distribuição da frequência dos genótipos do SNP *TXNIP* +402 T/C de acordo com a presença ou ausência de ND franca no sexo masculino

	Sem ND franca	Com ND franca	Valor de p
Genótipo CC	55/75 (73,3%)	29/54 (53,7%)	0,021

ND – Nefropatia diabética

A análise de regressão logística demonstrou que o genótipo CC perdeu significância (OR= 0,59; IC 95% 0,25-1,39, $p= 0,22$) (Tabela 23).

Tabela 23. Análise de regressão logística com a nefropatia diabética franca como variável dependente em portadores de DM1 do sexo masculino

Variável	OR	IC (95%)	Valor de p
Tempo DM	0,88	0,36-2,14	NS
Idade ao diagnóstico	1,26	0,52-3,02	NS
Hipertensão arterial	2,8	1,17-6,91	0,02
Triglicérides	2,61	1,01-6,93	0,04
Colesterol total	1,74	0,73-4,10	NS
HbA1c	1,50	0,63-3,59	NS
<i>TXNIP</i> (Genótipo CC)	0,59	0,25-1,39	NS

OR – *odds ratio*; IC – intervalo de confiança

Análise de acordo com o genótipo

A análise das características clínicas e laboratoriais de acordo com o genótipo demonstrou que os níveis de triglicérides e as frequências de ND estabelecida, ND franca e RFG<60 mL/min/1,73 m² foram as variáveis significativamente diferentes entre os genótipos TT+TC *versus* CC no sexo masculino (Tabela 24).

Tabela 24. Análise das características clínicas e laboratoriais dos pacientes do sexo masculino de acordo com o genótipo do SNP TXNIP +402 T/C

Variável	TT+TC (n=62)	CC (n=122)	Valor de p
Idade Atual (anos)	37 (29-44)	36 (29-44)	0,59
Idade ao diagnóstico (anos)	15 (8-21,5)	13 (7-20,5)	0,76
Tempo DM (anos)	22 (19-26)	21 (16-26,5)	0,63
HbA1c (%)	8,5 (7-9,9)	8,2 (7,3-9,9)	0,21
Colesterol total (mg/dL)	175 (151,7-197)	162 (145,5-194,5)	0,43
HDL (mg/dL)	49 (43-55,5)	53 (44-64)	0,08
LDL (mg/dL)	105 (82-127)	88 (73-112)	0,22
Triglicérides (mg/dL)	104 (68,5-134)	79 (51-110,5)	0,01
Uso de hipolipemiante (%)	16,1	19,1	0,68
Uso de anti-hipertensivo (%)	24,1	26,4	0,85
HAS (%)	52,4	45,6	0,42
Nefropatia diabética franca (%)	48,2	30,1	0,029
RFG<60 mL/min/1,73 m²	55,5	34,5	0,025
Nefropatia diabética estabelecida (%)	60	38,2	0,0069

4.2.7 Gene GLRX – rs6556885

A distribuição do SNP -2763 A/G foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg apenas na casuística de pacientes com DM1 do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e nos indivíduos controle não diabéticos.

Considerando-se apenas a população de Porto Alegre, não se observou diferença na frequência dos genótipos desse SNP entre a população diabética e a população controle não diabética (Tabela 25).

Tabela 25. Frequência dos genótipos do SNP -2763 A/G do gene *GLRX* em portadores de DM1 e em indivíduos controle não diabéticos

Genótipos	Portadores de diabetes tipo 1 (n =167)	Controles não diabéticos (n=100)
<i>GLRX/AA</i> (%)	6,5%	10%
<i>GLRX/AG</i> (%)	37,7%	43%
<i>GLRX/GG</i> (%)	55,6%	47%

Análise de acordo com a presença ou ausência de ND estabelecida

Não houve diferença significativa na frequência dos genótipos entre pacientes (apenas de Porto Alegre) com e sem ND estabelecida no modelo dominante ou recessivo.

Análise de acordo com o RFGe

Não houve diferença significativa na frequência dos genótipos no modelo dominante ou recessivo quando considerada a população de pacientes de Porto Alegre.

Análise de acordo com a presença ou ausência de ND franca

Não houve diferença significativa na frequência dos genótipos no modelo dominante ou recessivo quando considerada a população de pacientes de Porto Alegre.

4.2.8 Gene TKT

SNP -3787 T/G – rs7637934

A distribuição dos genótipos do SNP -3787 T/G foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg apenas na casuística de pacientes DM1 de São Paulo e nos indivíduos controle não diabéticos.

Considerando-se apenas a população do estado de São Paulo, não se observou diferença na frequência dos genótipos desse polimorfismo entre a população diabética e a população controle não diabética (Tabela 26).

Tabela 26. Frequência dos genótipos do SNP -3787 T/G do gene *TKT* em portadores de DM1 e em indivíduos controle não diabéticos

Genótipos	Portadores de DM1 (n =298)	Controles não diabéticos (n=218)
<i>TKT/TT</i> (%)	48%	48,2%
<i>TKT/TG</i> (%)	40,3 %	42,7%
<i>TKT/GG</i> (%)	11,7%	9,2%

Análise de acordo com a presença ou ausência de ND estabelecida

As análises nos modelos dominante e recessivo não demonstraram diferenças significantes na frequência dos genótipos entre os grupos com e sem ND estabelecida.

Análise de acordo com o RFGe

Não houve diferença significativa na frequência dos genótipos no modelo dominante ou recessivo quando considerada a população de pacientes portadores de diabetes de São Paulo

Análise de acordo com a presença ou ausência de ND franca

Não houve diferença significativa na frequência dos genótipos seja no modelo dominante ou recessivo quando considerada a população de pacientes portadores de diabetes de São Paulo.

SNP -1410 T/C – rs11130365

A distribuição dos genótipos do SNP -1410 T/C no gene *TKT* foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não houve diferença significativa na frequência dos genótipos desse polimorfismo entre a população diabética e a população controle não diabética (Tabela 27).

Tabela 27. Frequência dos genótipos do SNP -1410 T/C do gene *TKT* em portadores de DM1 e em indivíduos controle não diabéticos

Genótipos	Portadores de DM1 (n=463)	Controles não Diabéticos (n=100)
<i>TKT/TT</i> (%)	13,1%	12%
<i>TKT/CT</i> (%)	44,9%	52%
<i>TKT/CC</i> (%)	41,9%	36%

Análise de acordo com a presença ou ausência de ND estabelecida

Não houve diferença significativa na frequência dos genótipos entre pacientes com e sem ND estabelecida seja no modelo dominante ou recessivo.

Análise de acordo com o RFG_e

Não houve diferença significativa na frequência dos genótipos entre pacientes com RFG_e < ou ≥ 60 mL/min/1,73m², no modelo dominante ou recessivo.

Análise de acordo a presença ou ausência de ND franca

Não houve diferença significativa na frequência dos genótipos entre pacientes com e sem ND franca seja no modelo dominante ou recessivo.

A Tabela 28 abaixo apresenta resumidamente todas as associações encontradas entre os SNPs estudados e a doença renal ou o DM1.

Tabela 28. Resumo das associações encontradas no estudo

Polimorfismo	População	Alelo de risco	Doença
<i>GPX4</i> +718C/T (rs713041)	Todos os centros (Sexo masculino)	C (ancestral)	ND estabelecida
<i>GPX4</i> +718C/T (rs713041)	Todos os centros (Sexo masculino)	C (ancestral)	ND franca
<i>TXN</i> -224 T/A (rs2301242)	Todos os centros (Sexo feminino)	A (polimórfico)	ND franca
<i>TXNIP</i> +402 T/C (rs7211)	Todos os centros	T (ancestral)	DM1
<i>TXNIP</i> +402 T/C (rs7211)	Todos os centros (Sexo masculino)	T (ancestral)	ND estabelecida

5 DISCUSSÃO

As complicações diabéticas microvasculares são uma das principais causas de cegueira, doença renal terminal e neuropatias debilitantes⁽⁶¹⁾. O estresse oxidativo foi descrito com fator unificador das vias de dano celular induzido pela hiperglicemia⁽¹⁾ e seu aumento já foi demonstrado em portadores de DM em vários estudos^(9-12, 14, 15, 62-65). A associação entre SNPs em genes que codificam enzimas que participam de sistemas de defesa antioxidante e complicações crônicas do DM foi pouco explorada na literatura⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾.

Para o estudo da associação dos polimorfismos com as complicações renais foram realizadas três formas de análise da doença renal; considerando a presença ou não de ND estabelecida, presença ou ausência de ND franca e do RFGe ≥ 60 mL/min/1,73 m² ou < 60 mL/min/1,73 m².

Optou-se pela análise dessas diferentes formas de classificação da doença renal no DM, pois o conceito de que a microalbuminúria sempre precede a queda da RFG e de que todos os pacientes com doença renal terminal desenvolvem previamente proteinúria tem sido questionado. Vários estudos têm avaliado melhor a relação temporal entre o início da perda da função renal e a EAU. No *Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study*, por exemplo, quase 10% dos pacientes com microalbuminúria incidente já apresentavam franca diminuição da função renal no momento do início da microalbuminúria, indicando que o declínio da função renal pode preceder a microalbuminúria⁽⁶⁹⁾. Assim, embora a medida da albuminúria seja essencial para o diagnóstico da ND clássica, alguns pacientes apresentam diminuições no RFG em vigência de

normoalbuminúria, razão pela qual consideramos interessante também avaliar a associação dos SNPs com o RFG.

Na caracterização dos pacientes em relação à presença ou ausência das complicações renais, maior idade atual, maior tempo de DM1, maior frequência de HAS, maior trigliceridemia e colesterolemia foram os fatores de risco clássicos⁽⁷⁰⁾ que conferiram risco para a presença de ND estabelecida e de RFG < 60 mL/min/1,70 m² na análise univariada. Já na análise comparativa entre pacientes com e sem ND franca, maior frequência de HAS, maior trigliceridemia e colesterolemia foram observados nos pacientes com ND franca. Como essas variáveis tanto podem contribuir para o comprometimento renal, como serem consequências deste, é interessante a realização da análise das características demográficas, clínicas e laboratoriais por genótipo de cada um dos SNPs para os quais foram observadas associações com o acometimento renal.

A ausência de associação dos desfechos renais avaliados com uma maior HbA1c deveu-se, provavelmente, à uma certa homogeneidade da população estudada no que se refere ao controle glicêmico.

Dentre os SNPs estudados, a frequência do genótipo TT (homozigose para o alelo ancestral) do SNP +402 T/C no gene *TXNIP* foi maior nos pacientes portadores de DM1 em relação aos controles. Assim, a casuística de indivíduos controles foi ampliada para 705 pacientes com DM1 (inclusão de portadores de DM1 do banco de DNA da Equipe Médica de Diabetes que não preenchiam os critérios de inclusão para a entrada no estudo das complicações) e 626 controles. A análise estatística mostrou que os grupos

foram significativamente diferentes, especialmente quando se analisou apenas as pacientes do sexo feminino. Isso sugeriu que esse SNP pudesse conferir susceptibilidade para o aparecimento do DM1.

A TXNIP tem sido considerada o elo de ligação entre a glicotoxicidade e a apoptose das células beta no DM2⁽⁵⁰⁾: a hiperglicemia gera ROS, o que induz a dissociação da TXNIP da TXN. A TXNIP livre liga-se ao inflamassomo NALP3, um complexo multiprotéico que contém caspase 1, que é ativada e processa a pró-interleucina 1 β em interleucina 1 β madura. Esta citocina é capaz de induzir a apoptose das células beta⁽⁷¹⁾. Uma vez que a interleucina 1 β está implicada na apoptose das células beta que ocorre no DM1, é razoável supor que a TXNIP, influenciando o grau de ativação dessa interleucina, poderia participar da predisposição ao desenvolvimento dessa doença autoimune.

Com o objetivo de verificar se esse achado seria reprodutível em outra população, esse SNP foi genotipado em 1.285 portadores de DM1 e 3.065 indivíduos controle franceses sob a responsabilidade do Prof. Gilberto Velho (Inserm, Unidade de Pesquisa 695, Paris, França), mas não foram observadas diferenças significantes nas frequências do genótipo TT entre as populações de controles e portadores de DM1, que foram muito baixas, semelhante àquelas descritas no HapMap para a população caucasiana. Como a frequência do genótipo TT é maior nas populações africanas que nas populações caucasianas, é possível que a maior frequência desse genótipo na população estudada de portadores de DM1 resulte de uma maior frequência de pacientes de ancestralidade africana no grupo de

pacientes do que no grupo de controles não diabéticos, o que pode ter levado a um resultado falso positivo. Não podemos descartar, entretanto, a participação desse SNP na predisposição ao DM1 em nossa população, que difere consideravelmente de outras populações pela marcante presença da miscigenação.

Estudos recentes demonstram que a hiperglicemia leva a um comprometimento do sistema TXN, como consequência de múltiplas mudanças que incluem o aumento da expressão endógena do *TXNIP* e redução da atividade de TXN⁽⁷²⁾. Além disso, foi demonstrado que a expressão da *TXNIP* está significativamente aumentada em células tubulares renais expostas a hiperglicemia^(73, 74). Em nosso estudo, a análise entre o SNP *TXNIP* +402 T/C e a doença renal revelou associação entre a presença do genótipo CC e proteção contra a ND estabelecida nos pacientes do sexo masculino, mesmo após a correção para os possíveis fatores de confusão. A análise das características clínicas e laboratoriais dos pacientes por genótipo demonstrou que os portadores do genótipo CC também apresentaram menores concentrações plasmáticas de triglicérides, o que poderia contribuir para um desfecho renal mais favorável, dificultando que se atribua o papel protetor apenas ao genótipo. Como um excesso de *TXNIP* inibe a TXN, poderia se especular que o genótipo CC exerce um efeito protetor por estar associado a uma menor transcrição gênica e assim, resultar em menores concentrações renais da proteína *TXNIP*. Se esta associação se deveria a um efeito funcional do próprio SNP ou a um desequilíbrio de ligação com uma outra variante funcional permanece por ser elucidado.

O SNP -224 T/A no gene *TXN* foi escolhido por localizar-se a distância de uma base da possível sequência de ligação do fator de transcrição AP-4 (*activating enhancer binding protein 4*), que se liga ao motivo 5'-CAGCTG-3'⁽⁷⁵⁾. Muito pouco foi estudado a respeito de SNPs no gene *TXN*, principalmente em sua região promotora. Em nossa análise foi encontrada associação significativa entre a presença do alelo polimórfico em homozigose e a ND franca em mulheres, o que se constitui em uma casuística pequena. Dado o reconhecido papel da *TXN* na hiperglicemia⁽⁷²⁾, seria interessante o aumento da casuística para que se possam tirar conclusões definitivas sobre a susceptibilidade conferida por esse SNP, que também nunca foi estudado do ponto de vista funcional.

Em relação à proteína GPX-4, ela é detectada na maioria dos tecidos, tanto no citosol, como associada a membranas⁽²⁷⁾. No que se refere ao SNP +718C/T, sua importância dá-se pelo fato de sua localização poder modular a síntese de GPX-4 pela alteração da afinidade da maquinaria de inserção de selenocisteína no elemento SECIS (sequência de inserção de selenocisteína), localizado na região 3'UTR do gene.

Primeiramente em 2002, demonstrou-se associação entre a ocorrência do SNP +718C/T e aumento dos produtos totais de 5-lipoxigenase em linfócitos de indivíduos saudáveis com genótipo CC (aumento de 36% e 44%, em relação aos genótipos TT e TC, respectivamente). Assim, estabeleceu-se a funcionalidade do SNP com relação à síntese de leucotrienos levando, portanto, à modulação de processos inflamatórios⁽³²⁾. Posteriormente, um estudo de Bermano e

cols.⁽³¹⁾ detectou uma maior proporção de indivíduos com genótipo CC entre pacientes portadores de câncer colorretal.

Os efeitos funcionais desse SNP e sua interação com sexo também foram estudados por Méplan e cols. Neste trabalho, foi proposto que este SNP altera a capacidade de incorporação de selenocisteína na região 3'UTR do RNA mensageiro da GPX-4 e que, em baixas concentrações de selênio, esse SNP poderia influenciar na susceptibilidade a doenças. Na comparação entre os sexos, a razão atividade/proteína de GPX-4 foi significativamente maior em homens, indicando a regulação de sua expressão nesse sexo, que mantém concentrações de GPX-4 linfocitária mais altas que em mulheres⁽³⁰⁾.

O alelo ancestral C também foi associado ao aumento de risco de morte por câncer de mama com uma razão de 1,27 para cada alelo C, após análise multivariada. O mesmo estudo não identificou diferenças de expressão do RNA mensageiro dentre os genótipos⁽⁷⁶⁾.

Em nosso estudo, encontramos associação entre a presença do alelo polimórfico T e menor ocorrência de ND estabelecida e ND franca em homens, mesmo após a correção para os possíveis fatores de confusão, o que corrobora os achados de que esse gene é regulado de forma diferente no sexo masculino em relação ao sexo feminino. Além disso, a presença do alelo polimórfico T também poderia ser um fator de proteção contra as concentrações aumentadas de 5-lipoxigenase, uma vez que é sabido que o aumento de ROS pode orquestrar respostas inflamatórias nos tecidos⁽⁷⁷⁾.

Em relação ao gene da *TKT*, inúmeras evidências têm sugerido que o aumento da atividade e/ou expressão dessa enzima pode ser associada a

diminuição de complicações diabéticas^(53, 78-82), pois em condições de hiperglicemia, o excesso dos produtos da glicólise F6P e GA3P, envolvidos na ativação de vias deletérias poderiam ser desviados para a VPF pela ação dessa enzima⁽¹⁹⁾.

O SNP-3787 T/G foi escolhido devido a sua localização na região promotora, próximo ao provável sítio de ligação ao fator de transcrição PPAR- γ . A análise deste SNP foi realizada apenas na população do estado de São Paulo. A princípio, o alelo polimórfico foi mais frequente nos pacientes portadores de diabetes que nos controles não diabéticos (n=100), fazendo-se necessário o aumento da casuística dos últimos. Ao aumentar a casuística do grupo controle para 218 indivíduos, constatamos que as frequências nas populações diabética e não diabética foram semelhantes e que esse SNP não se associou ao comprometimento renal na população de DM1 estudados.

Os achados apresentados devem ser interpretados no contexto das limitações de estudos transversais, e alguns dos SNPs precisam ser analisados após o aumento da casuística para que se possam tirar conclusões definitivas. Apesar disso, esse estudo amplia o espectro de possíveis genes candidatos pertencentes a vias anti-oxidantes para o acometimento renal no DM tipo 1 e corroboram a suposição que abordagens terapêuticas que melhorem as defesas anti-oxidantes poderiam ser uma estratégia para prevenir ou retardar as complicações crônicas do DM.

6 CONCLUSÕES

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

1. No polimorfismo funcional **GPX4 +718C/T** a presença de pelo menos um alelo polimórfico T conferiu proteção contra a ND estabelecida e a ND franca em pacientes do sexo masculino;
2. A presença de dois alelos polimórficos A do SNP **TXN -224 T/A** foi um fator de risco independente para a ND franca em pacientes do sexo feminino;
3. A frequência do genótipo TT (homozigose para o alelo ancestral) do SNP **TXNIP +402 T/C** foi maior nos pacientes portadores de DM1 em relação aos controles não diabéticos;
4. A presença de dois alelos polimórficos C do SNP **TXNIP +402 T/C** foi um fator de proteção contra ND estabelecida em pacientes do sexo masculino;
5. Genes que codificam enzimas que participam do metabolismo da GSH e da TXN estão envolvidos na susceptibilidade genética para o desenvolvimento de complicações renais.

7 ANEXOS

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME: :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO:.....Nº APTO:.....
BAIRRO:.....CIDADE:.....
CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA**

Estudo da Associação entre Polimorfismos em Genes Relacionados a Vias Antioxidantes Endógenas e a Susceptibilidade a Nefropatia em Pacientes Diabéticos Tipo 1

PESQUISADOR: Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella

CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente e Professora Pesquisadora

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 62926

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 01/09/2009 a 19/05/2012

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

O diabetes melito tipo é uma doença que se caracteriza por aumento da glicemia (açúcar no sangue). Há vários tipos de diabetes: algumas pessoas têm maior risco de desenvolver diabetes do que outras, principalmente as que tem parentes com diabetes. Em outras famílias, a frequência de diabetes é tão alta que é quase certo que a maior parte dos filhos terão diabetes. Às vezes, no entanto, o acometimento familiar é relativamente raro. Além disso, o descontrole do diabetes por longo tempo pode levar ao desenvolvimento de outras doenças como diminuição ou perda da visão, problemas nos rins e nos nervos. Convidamos o(a) Senhor(a) a participar de uma pesquisa que tem por objetivo identificar genes que possam estar relacionados a causa para o desenvolvimento das doenças associadas ao seu diabetes.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros

Caso o(a) Senhor(a) concorde em participar deste estudo, vamos colher uma amostra de seu sangue de uma veia de seu braço, para a extração do material genético (DNA). Este material será usado no estudo dos genes potencialmente envolvidos na susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças associadas ao diabetes melito. Este material genético será armazenado e poderá ser utilizado em novos projetos de pesquisa devidamente aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos

Somente será realizada a coleta de sangue de uma veia de seu braço para a obtenção de material genético.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3

O único desconforto que o (a) Sr (a) sentirá será uma picada no seu braço para a retirada do sangue onde será realizada a pesquisa de alterações do seu material genético. Os riscos deste procedimento são mínimos, como a formação de hematomas ou pequeno sangramento local.

5 – Benefícios para o participante

Não há benefício direto para o participante. Existe a possibilidade de que após a realização desse estudo, sejam identificados fatores genéticos que aumentam o risco para o desenvolvimento das doenças associadas ao diabetes. Com isso, no futuro, poderemos diagnosticar e tratar com precisão os portadores de diabetes, identificar em familiares os que têm risco de ter diabetes e indicar a prioridade para futuras estratégias de prevenção e de controle intensivo dos portadores de diabetes com maior risco de desenvolver essas doenças associadas.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar

Como a retirada do sangue para a pesquisa do material genético não é um procedimento para tratamento, não há procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o(a) Sr(a), caso o Sr (a) opte por não retirar o sangue.

7 – Garantia de acesso

Em qualquer etapa do estudo, o (a) Sr(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella; Telefone(s) 3061-7253, ramal 13. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – O (A) Sr (a) tem liberdade para retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência médica que o Sr. (a) recebe no Hospital das Clínicas.

09 – Direito de confidencialidade: Todos os dados obtidos, tais como: resultados de exames e testes, bem como do prontuário, somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos e não será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.), de forma a impedir qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva no caso de resultados indicativos de desenvolvimento de diabetes ou de suas complicações. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

10 – O (A) Sr(a) tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o “Estudo da Associação entre Polimorfismos em Genes Relacionados a Vias Antioxidantes Endógenas e a Susceptibilidade a Nefropatia em Pacientes Diabéticos Tipo 1”

Eu discuti com a Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

ANEXO B – Aprovação Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq do HCFMUSP



APROVAÇÃO

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 25/08/2009, **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **0803/09**, intitulado: **"Estudo da Associação entre Polimorfismos em Genes Relacionados a Vias Antioxidantes Endógenas e a Susceptibilidade a Nefropatia em Pacientes Diabéticos Tipo 1"** apresentado pelo **Departamento de Clínica Médica**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisadora Responsável: Profa. Dra. Maria Lucia Cardillo Corrêa Gianella

Pesquisadora Executante: Sra. Maria Beatriz Camargo de Almeida Monteiro

CAPPesq, 25 de agosto de 2009

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail:

cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Julio Cesar

ANEXO C – Adendo da Aprovação Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq do HCFMUSP



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12/05/2010, **APROVOU o(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº **0803/09**, intitulado: "**Estudo da Associação entre Polimorfismos em Genes Relacionados a Vias Antioxidantes Endógenas e a Susceptibilidade a Nefropatia em Pacientes Diabéticos Tipo 1.**" apresentado pelo Departamento de **Clínica Médica**.

- **adendo ao projeto**

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dra. Maria Lúcia Cardilho Corrêa Gianella**

CAPPesq, 12 de Maio de 2010.

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão de
Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

César

8 REFERÊNCIAS

1. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
2. Inzucchi SE. *Diabete melito: manual de cuidados essenciais*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.
3. 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;329(14):977-86.
4. Reichard P, Britz A, Cars I, Nilsson BY, Sobocinsky-Olsson B, Rosenqvist U. The Stockholm Diabetes Intervention Study (SDIS): 18 months' results. *Acta Med Scand*. 1988;224(2):115-22.
5. Zatz R. *Fisiopatologia Renal*. 2a. edição ed. Silva MR, editor. São Paulo: Atheneu; 2002.
6. Brownlee M, Aiello LP, Friedman E, Vinik AI, Nesto RW, Boulton AJM. *Complications of Diabetes Mellitus*. 10th ed: Philadelphia: Saunders; 2003.
7. Rossing P. The changing epidemiology of diabetic microangiopathy in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2005;48(8):1439-44.
8. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complication. *Nature*. 2001;414:813-20.
9. Piconi L. Oxidative stress in diabetes. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41(9):114-49.
10. 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;17:7-10.
11. 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;21(9):1529-33.
12. 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 368:225-9.
13. Ceriello A. Nitrotyrosine: new findings as a marker of postprandial oxidative stress. *Int J Clin Pract Suppl*. 2002(129):51-8.

14. Ceriello A, Quagliaro, L., Catone, B., Pascon, R., Piazzola, M., Bais, B. et al. Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes Care*. 2002;25:1439-43.
15. 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;51(9):2817-25.
16. Seaquist E, Goetz F, Rich S, Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med*. 1989;320(18):1161-5.
17. Fioretto P, Steffes MW, Barbosa J, Rich SS, Miller ME, Mauer M. Is diabetic nephropathy inherited? Studies of glomerular structure in type 1 diabetic sibling pairs. *Diabetes*. 1999;48(4):865-9.
18. Corrêa-Giannella ML, Vieira SM. Genetic susceptibility to microangiopathy development in Type 1 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(2):375-86.
19. Horecker B. The pentose phosphate pathway. *J Biol Chem*. 2002;277(50):47965-71.
20. Ukkola O, et al. 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;249:451-9.
21. Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res*. 1994;54:1969-75.
22. Franco R, Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch of Physiol and Biochemistry*. 2007;113:234-58.
23. Dincer Y AT, Alademir Z, Ilkova H. Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 2002;51(10):1360-2.
24. Vieira SM, Monteiro MB, Marques T, Luna AM, Fortes MA, Nery M, et al. Association of genetic variants in the promoter region of genes encoding p22phox (CYBA) and glutamate

- cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) and renal disease in patients with type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genet.* 2011;12(1):129.
25. Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1985;839:62-70.
26. Thomas JP, Geiger PG, Maiorino M, Ursini F, Girotti AW. Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1990;1045:252-60.
27. Arai M, Imai H, Koumura T, Yoshida M, Emoto K, Umeda M, et al. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. *J Biol Chem.* 1999;274:4924-33.
28. Kim BC, Kim WY, Park D, Chung WH, Shin KS, Bhak J. SNP@Promoter: a database of human SNPs (single nucleotide polymorphisms) within the putative promoter regions. *BMC Bioinformatics.* 2008;9 Suppl 1:S2.
29. Zhou LZH, Johnson AP, Rando TA. NFκB and PA-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:1405-16.
30. Méplan C, Crosley L, Nicol F, Horgan G, Mathers J, Arthur J, et al. Functional effects of a common single-nucleotide polymorphism (GPX4c718t) in the glutathione peroxidase 4 gene: interaction with sex. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(4):1019-27.
31. Bermano G, Pagmantidis V, Holloway N, Kadri S, Mowat N, Shiel R, et al. Evidence that a polymorphism within the 3'UTR of glutathione peroxidase 4 is functional and is associated with susceptibility to colorectal cancer. *Genes Nutr.* 2007;2(2):225-32.
32. Villette S, Kyle J, Brown K, Pickard K, Milne J, Nicol F, et al. A novel single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of human glutathione peroxidase 4 influences lipoxygenase metabolism. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;29(2):174-8.
33. Webb GC, Vaska VL, Gali RR, Ford JH, Board PG. The gene encoding human glutathione synthetase (GSS) maps to the long arm of chromosome 20 at band 11.2. *Genomics* 1995;30:617-19.

34. Hea X, Kanb H, Caic L, Maa Q. Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2008;46:47-58.
35. Yoh K, Hirayama A, Ishizaki K, Yamada A, Takeuchi M, Yamagishi S, et al. Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. *Genes Cells*. 2008;13:1159-70.
36. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 2005;16:577-86.
37. Nagaoka Y, Iuchi Y, Ikeda Y, Fujii J. Glutathione reductase is expressed at high levels in pancreatic islet cells. *Redox Rep*. 2004;9(6):321-4.
38. Dinçer Y, Alademir Z, Ilkova H, Akçay T. Susceptibility of glutathione and glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: effect of glycemic control *Clinical Biochemistry*. 2002;35:297-301.
39. Wang T, Zhang X, Li JJ. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol*. 2002;2(11):1509-20.
40. Sun Y, Oberley LW. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med*. 1996;21:335-48.
41. Lillig CH, Berndt C, Holmgren A. Glutaredoxin systems *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008;1780 1304-17.
42. Berndt C, Lillig CH, Holmgren A. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(3):H1227-36.
43. Shelton MD, Kern TS, Mieyal JJ. Glutaredoxin Regulates Nuclear Factor k-B and Intercellular Adhesion Molecule in Müller Cells - Model od diabetic retinopathy. *J Biol Chem*. 2007;282:12467-74.
44. Li X, Xu Z, Li S, Rozanski GJ. Redox regulation of Ito remodeling in diabetic rat heart *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288 1417-24

45. Lenhard J. PPAR gamma/RXR as a molecular target for diabetes. *Receptors Channels*. 2001;7(4):249-58.
46. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*. 2001;31:1287-312.
47. Maulik N, Das DK. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008;1780:1368-82.
48. Hamada Y, Miyata S, Nii-Kono T, Kitazawa R, Kitazawa S, Higo S, et al. Overexpression of thioredoxin1 in transgenic mice suppresses development of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 22:1547-57.
49. Yamamoto M, Yamato E, Toyoda S, Tashiro F, Ikegami H, Yodoi J, et al. Transgenic expression of antioxidant protein thioredoxin in pancreatic beta cells prevents progression of type 2 diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:43-9.
50. Chen J, Saxena G, Mungrue IN, Lusic AJ, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis. *Diabetes*. 2008;57(4):938-44.
51. Advani A, Gilbert RE, Thai K, Gow RM, Langham RG, Cox AJ, et al. Expression, localization, and function of the thioredoxin system in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(4):730-41.
52. Zhao J, Zhong C. A review on research progress of transketolase. *Neurosci Bull*. 2009;25(2):94-9.
53. Babaei-Jadidi R, Karachalias N, Ahmed N, Battah S, Thornalley P. Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. *Diabetes*. 2003;52(8):2110-20.
54. Shastry BS. Genetic markers for disease and drug response. *Int J Mol Med*. 2003;11:379-8.
55. Shastry BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol*. 2009;578:3-22.
56. Riley JH, Allan CJ, Lai E, Roses A. The use of single nucleotide polymorphisms in the isolation of common disease genes. *Pharmacogenomics*. 2000;1(1):39-47.

57. Girach A, Manner D, Porta M. Diabetic microvascular complications: can patients at risk be identified? A review. *Int J Clin Pract*. 2006;60:1471-83.
58. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2004;27 Suppl 1:S5-S10.
59. Levey A, Bosch J, Lewis J, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med*. 1999;130(6):461-70.
60. Martínez-Ramírez HR, Jalomo-Martínez B, Cortés-Sanabria L, Rojas-Campos E, Barragán G, Alfaro G, et al. Renal function preservation in type 2 diabetes mellitus patients with early nephropathy: a comparative prospective cohort study between primary health care doctors and a nephrologist. *Am J Kidney Dis*. 2006;47(1):78-87.
61. The World Health Organization website. [cited 2008]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>.
62. Davi G, Ciabattoni G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation*. 1999;99(2):224-9.
63. 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;48(11):1402-8.
64. 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.
65. 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;41(18):1454-60.
66. 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;25(5):509-13. Epub 2006/08/24.

67. Hossaini AM, Zamrioni 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. Epub 444.
68. 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;111(22):2927-34. Epub 2005/06/02.
69. Costacou T, Ellis D, Fried L, Orchard TJ. Sequence of progression of albuminuria and decreased GFR in persons with type 1 diabetes: a cohort study. *Am J Kidney Dis*. 2007;50(5):721-32.
70. Gross J, de Azevedo M, Silveiro S, Canani L, Caramori M, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care*. 2005;28(1):164-76.
71. Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science*. 2010;327(5963):296-300.
72. Advani A, Gilbert RE, Thai K, Gow RM, Langham RG, Cox AJ, et al. Expression, Localization, and Function of the Thioredoxin System in Diabetic Nephropathy *J Am Soc Nephrol*. 2009.
73. Shalev A, Pise-Masison CA, Radonovich M, Hoffmann SC, Hirshberg B, Brady JN, et al. Oligonucleotide microarray analysis of intact human pancreatic islets: identification of glucose-responsive genes and a highly regulated TGFbeta signaling pathway. *Endocrinology*. 2002;143(9):3695-8.
74. Qi W, Chen X, Gilbert RE, Zhang Y, Waltham M, Schache M, et al. High glucose-induced thioredoxin-interacting protein in renal proximal tubule cells is independent of transforming growth factor-beta1. *Am J Pathol*. 2007;171(3):744-54.
75. Hu YF, Lüscher B, Admon A, Mermoud N, Tjian R. Transcription factor AP-4 contains multiple dimerization domains that regulate dimer specificity. *Genes Dev*. 1990;4(10):1741-52.

76. Udler M, Maia AT, Cebrian A, Brown C, Greenberg D, Shah M, et al. Common germline genetic variation in antioxidant defense genes and survival after diagnosis of breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(21):3015-23.
77. Niethammer P, Grabher C, Look A, Mitchison T. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*. 2009;459(7249):996-9.
78. Stracke H, Lindemann A, Federlin K. A benfotiamine-vitamin B combination in treatment of diabetic polyneuropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1996;104(4):311-6.
79. Stracke H, Gaus W, Achenbach U, Federlin K, Bretzel R. Benfotiamine in diabetic polyneuropathy (BENDIP): results of a randomised, double blind, placebo-controlled clinical study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2008;116(10):600-5.
80. Hammes H, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med*. 2003;9(3):294-9.
81. Beltramo E, Nizheradze K, Berrone E, Tarallo S, Porta M. Thiamine and benfotiamine prevent apoptosis induced by high glucose-conditioned extracellular matrix in human retinal pericytes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009;25(7):647-56.
82. Balakumar P, Chakkarwar V, Singh M. Ameliorative effect of combination of benfotiamine and fenofibrate in diabetes-induced vascular endothelial dysfunction and nephropathy in the rat. *Mol Cell Biochem*. 2009;320(1-2):149-62.