TATIANA MARQUES FERREIRA DA ROCHA

**Associação entre polimorfismos nos genes *SLC2A1*, *SLC2A2*,
HNF1A, *TGFB1* e *DCP1A* e nefropatia 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: Maria Lúcia 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

Rocha, Tatiana Marques Ferreira da

Associação entre polimorfismos nos genes SLC2A1, SLC2A2, HNF1A, TGFB1 e
DCP1A e nefropatia em portadores de
Diabetes Mellitus Tipo 1 / Tatiana Marques Ferreira da Rocha. -- São Paulo, 2012.

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

Orientador: Prof. Dr. Maria Lúcia Corrêa-Giannella.

Descritores: 1.Nefropatias diabéticas 2.Diabetes Mellitus tipo 1 3.Polimorfismo de
nucleotídeo único 4.Transportador de glucose tipo 1 5. Transportador de glucose
tipo 2 6.Fator 1-alfa nuclear de hepatócito 7.Fator de crescimento transformador
beta 8.Proteína smad 4 9.DCP1A

USP/FM/DBD- 147/12

*Dedico este trabalho a minha família,
Obrigada pelo amor, dedicação e companheirismo.
Que Deus nos abençoe sempre.*

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais **Amaro Marques da Rocha** (*in memorian*) e **Maria das Neves** pelo incentivo, pelas palavras de sabedoria e paciência. Amo vocês, obrigada pela vida.
- Um agradecimento especial para minha orientadora **Maria Lúcia Corrêa-Giannella**, exemplo de profissional. Obrigada Malu, pela paciência, ensinamentos e incentivo.
- Às minhas irmãs: **Joleone**, **Jaciara** e **Simone**, obrigada pelas risadas, conversas e ombro amigo.
- Meu irmão **Dermeval** (*in memorian*), meu herói, que me ensinou o valor do trabalho digno. Amo você mano, por toda minha vida.
- Meu cunhado **Wesley**, você é como um irmão, agradeço por fazer parte das nossas vidas e por fazer minha irmã feliz.
- Meus animais de estimação: **Max**, **Chester** e **Zurk**, não precisamos de palavras para nos entendermos, amo vocês incondicionalmente.
- Minhas **amigas** e **amigos**, pelas baladas, descontração e pelas palavras de ajuda, nos momentos em que eu mais precisei.
- Ao mestrando **Thiago Patente** pela ajuda com as análises estatística.
- Aos biólogos e técnicos do laboratório: **Ana Mercedes**, **Maria Auxiliadora** e **Marco Antônio**, pela ajuda com as técnicas e pelas conversas.
- Aos **pacientes** que contribuíram para a realização desse trabalho.

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. Divisão 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: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1 -	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Nefropatia Diabética.....	1
1.2	Transportadores de glicose e complicações crônicas do diabetes.....	3
1.2.1	Transportador de glicose tipo 1 (GLUT-1).....	4
1.2.2	Transportador de glicose tipo 2 (GLUT-2).....	7
1.3	<i>HNF1-α</i>	8
1.4	<i>TGF-β1</i>	9
1.5	<i>DCP1A</i>	11
2 -	OBJETIVOS.....	13
3 -	MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1	Escolha dos SNPs.....	14
3.2	Casuística e protocolo clínico.....	14
3.3	Definição da nefropatia diabética.....	17
3.4	Extração do DNA.....	18
3.5	Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	19

3.6	Análise estatística.....	20
4 -	RESULTADOS.....	22
4.1	Análise das características clínicas dos pacientes.....	22
4.2	Análise das associações entre os SNPs e a nefropatia diabética.....	24
4.2.1	Gene <i>SLC2A1</i> (GLUT-1).....	24
4.2.2	Gene <i>SLC2A2</i> (GLUT-2).....	30
4.2.3	Gene <i>HNF1A</i> (HNF1- α).....	33
4.2.4	Gene <i>TGFB1</i> (TGF β -1).....	35
4.2.5	Gene <i>DCP1A</i> (SMIF)	38
4.3	Análise das associações entre os SNPs e o RFG.....	41
4.4	Valores de P ajustados pelo Teste de Múltiplas Hipóteses.....	42
5 -	DISCUSSÃO.....	43
6 -	CONCLUSÕES.....	50
7 -	REFERÊNCIAS	51
	APÊNDICE	

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

CEU	Europeus Caucasianos
DCP1A	<i>Decapping enzyme homolog A</i>
DL	Desequilíbrio de ligação
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DNA	Ácido desoxiribonucleíco
dNTP	Desoxiribonucleosídeos trifosfatos
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
EUA	Excreção urinária de albumina
EUA	Estados Unidos da América
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
GAD65	Descarboxilase do ácido glutâmico
GLUT-1	Transportador de glicose tipo 1
GLUT-2	Transportador de glicose tipo 2
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade
HNF1- α	<i>Hepatocyte nuclear factor 1 alpha</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HRE	Elemento responsivo à hipóxia
HSPE	Hospital do Servidor Publico Estadual
IA-2 e IA-2 β	anti-tirosina fosfatases

IC	Intervalo de confiança
IECA	Inibidor da enzima conversora de angiotensina
IMC	Índice de massa corpórea
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
Med	Mediana
MODY	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND	Nefropatia diabética
OR	<i>Odds Ratio</i>
PA	Pressão arterial
PKC	Proteína cinase C
PCR	Reação em cadeia da polimerase
r^2	Coeficiente de correlação
RFG _e	Ritmo de filtração glomerular estimado
SDS	Sódio dodecil Sulfato
SGLT	Transportador de glicose acoplada ao sódio
<i>SLC2A1</i>	<i>Solute carrier family 2, member 1</i>
<i>SLC2A2</i>	<i>Solute carrier family 2, member 2</i>
SMIF	<i>Smad4-interacting protein</i>
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
TE	TRIS-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Triglicerídeos

TGF- β 1	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TMH	Teste de Múltiplas Hipóteses
UTR	Região não traduzida
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
χ^2	Qui-quadrado
YY1	Yin Yang-1

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1:</i>	Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos portadores de DM1.....	23
<i>Tabela 2:</i>	Distribuição das frequências dos genótipos conforme o estágio da nefropatia diabética e o <i>odds ratio</i> para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo no gene <i>SLC2A1</i> (GLUT-1).....	26
<i>Tabela 3:</i>	Distribuição das frequências dos genótipos conforme o estágio da nefropatia diabética e o <i>odds ratio</i> para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo do gene <i>SLC2A2</i> (GLUT-2).....	31
<i>Tabela 4:</i>	Distribuição das frequências dos genótipos conforme o estágio da nefropatia diabética e o <i>odds ratio</i> para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo no gene <i>HNFαA</i> (HNF-1 α).....	34
<i>Tabela 5:</i>	Distribuição das frequências dos genótipos conforme o estágio da nefropatia diabética e o <i>odds ratio</i> para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo no gene <i>TGFB1</i> (TGF- β 1).....	36

<i>Tabela 6:</i>	Distribuição das frequências dos genótipos conforme o estágio da nefropatia diabética e o <i>odds ratio</i> para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo no gene <i>DCP1A</i> (SMIF).....	39
<i>Tabela 7:</i>	Distribuição das frequências dos genótipos conforme o ritmo de filtração glomerular estimado.....	41
<i>Tabela 8:</i>	Valores de <i>P</i> obtidos na regressão logística e após a correção (Teste de Múltiplas Hipóteses [TMH]).....	42

Lista de Figuras

<i>Figura 1:</i>	Gene <i>SLC2A1</i> humano. Localizado no cromossomo 1p34.2, com 10 exon e 3 <i>enhancers</i>	07
<i>Figura 2:</i>	Via de sinalização do fator de crescimento transformante (TGF- β).....	10

Resumo

Rocha T.M.F. Associação entre polimorfismos nos genes *SLC2A1*, *SLC2A2*, *HNF1A*, *TGFB1* e *DCP1A* e nefropatia em portadores de Diabetes Mellitus Tipo 1 [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A nefropatia diabética (ND) decorre da hiperglicemia crônica, de fatores de risco como a hipertensão arterial e a dislipidemia e de uma susceptibilidade genética já evidenciada em inúmeros estudos clínicos. Uma das características histológicas da ND é o acúmulo de proteínas de matriz extracelular no mesângio, para o qual contribuem várias vias bioquímicas. O GLUT-1, codificado pelo gene *SLC2A1*, é o principal transportador de glucose da célula mesangial e sua expressão está aumentada no glomérulo de animais diabéticos, o que constitui uma alça de *feedback* positivo pela qual a glicose extracelular aumentada estimula ainda mais sua própria captação, piorando a lesão mesangial. O GLUT-2, codificado pelo gene *SLC2A2*, é expresso nas células tubulares e nos podócitos e sua expressão também está aumentada na ND. A expressão deste transportador de glicose é regulada pelo fator de transcrição HNF-1 α . Participa, ainda, da lesão renal induzida pela hiperglicemia o fator de crescimento transformante - β (TGF- β), que exerce vários efeitos deletérios, tais como diminuir a atividade de metaloproteinases de matriz e promover fibrose renal. Esse fator de crescimento determina a ativação transcricional de genes-alvo, mas necessita de outros ativadores e co-ativadores da transcrição, tais como a proteína SMIF, codificada pelo gene *DCP1A*. Tendo em vista a participação das proteínas mencionadas acima na patogênese da ND, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a associação de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) nos genes *SLC2A1*, *SLC2A2*, *HNF1A*, *TGFB1* e *DCP1A* com a doença renal em portadores de diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Um total de 449 pacientes (56,4% do sexo feminino, idade média de 36,0 $\pm$ 11,0 anos) com mais de 10 anos de doença foram incluídos e classificados de acordo com o estágio de ND: (1) Ausência de ND: excreção urinária de albumina (EUA) normal (< 30 mg/24h ou < 20 μ g/min) e creatinina plasmática < 1,7 mg/dL sem tratamento anti-hipertensivo; (2) ND incipiente: microalbuminúria (EUA de 30 – 299 mg/24h ou 20 – 199 μ g/min) e creatinina plasmática < 1,7 mg/dL sem tratamento anti-hipertensivo e (3) ND Franca: macroalbuminúria (EUA > 300 mg/24h ou > 200 μ g/min) ou proteinúria ou tratamento para reposição renal. Também foram avaliadas as associações dos SNPs com o ritmo de filtração glomerular estimado (RFG_e). Os SNPs foram genotipados pela metodologia de reação em cadeia da polimerase em tempo real, com o uso de sondas fluorescentes. As associações dos SNPs com a ND foram avaliadas por análise de regressão logística e os *odds ratios* (OR) e respectivos intervalos de confiança (IC) de 95% foram calculados após ajuste para possíveis confundidores, que foram incluídos como co-variáveis no modelo de regressão. Valores de *P* < 0.05 (bicaudal) foram considerados estatisticamente significantes. As seguintes associações foram observadas: (1) gene *SLC2A1*: genótipos CT+TT do SNP rs841848

conferiram risco para a ND incipiente na população global (OR 1,88; CI95% 1,06-3,34; $P=0,03$) e nos pacientes do sexo masculino (OR 2,67; CI95% 1,13-6,35; $P=0,0247$) e para a ND franca (OR 2,70; CI95% 1,18-6,31; e $P=0,0197$) apenas nos pacientes do sexo masculino; genótipos GA+AA do SNP rs1385129 conferiram risco para a ND franca na população do sexo masculino (OR 3,09; CI95% 1,34-7,25; $P=0,0085$); genótipos AT + TT do SNP rs3820589, conferiram proteção contra a ND incipiente na população global (OR 0,36; CI95% 0,16-0,78; $P=0,0132$) e na população do sexo feminino (OR 0,14; CI95% 0,02-0,52; $P=0,0122$). (2) gene SLC2A2: genótipos GA+GG do SNP rs5396 conferiram proteção contra ND franca nos pacientes do sexo masculino (OR 0,29; CI95% 0,12-0,69; $P=0,0052$); os genótipos AG+GG do SNP rs6800180 conferiram proteção contra a ND franca nos pacientes do sexo masculino (OR 0,16; CI95% 0,14-0,90; $P=0,0324$). (3) gene HNF1A: genótipos AC + CC do SNP rs1169288 conferiram risco para ND franca na população global (OR 2,23; CI95% 1,16-4,38; $P=0,0175$); genótipos CG+GG do SNP rs1169289 conferiram risco para ND franca na população global (OR 3,43; CI95% 1,61-7,73; $P=0,002$); (4) Gene TGFB1: genótipos CT + TT do SNP 1800468 conferiram risco para ND incipiente na população total (OR 2,99; CI95% 1,26-7,02; $P=0,0116$) e o alelo polimórfico T do SNP rs1800469 conferiu risco para um menor RFGe ($p=0,0271$). (5) gene DCP1A: o alelo polimórfico A do SNP rs11925433 também se associou com um menor RFGe ($p=0,0075$). Em conclusão, SNPs em genes que codificam as proteínas envolvidas na patogênese da ND GLUT-1, GLUT-2, HNF-1 α , TGF- β e SMIF conferem susceptibilidade para essa complicação crônica nos portadores de DM1 avaliados no presente estudo.

Descritores: Nefropatias diabéticas, Diabetes Mellitus tipo 1, Polimorfismo de nucleotídeo único, Transportador de glucose tipo 1, Transportador de glucose tipo 2 , Fator 1-alfa nuclear de hepatócito , Fator de crescimento transformador beta, Proteína smad 4, DCP1A.

Summary

Rocha, T.M.F. Association between polymorphisms in the genes *SLC2A1*, *SLC2A2*, *HNF1A*, *TGFB1* e *DCPA1* and nephropathy in Type 1 Diabetes patients [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

Diabetic nephropathy (DN) results from chronic hyperglycemia, risk factors such as hypertension and dyslipidemia as well as from genetic susceptibility, already demonstrated in numerous clinical studies. A histological feature of DN is the accumulation of extracellular matrix proteins in the mesangium after activation of multiple biochemical pathways. GLUT-1, encoded by gene *SLC2A1*, is the major glucose transporter in mesangial cell and its expression is increased in the glomeruli of diabetic animals, comprising a positive feedback loop whereby high extracellular glucose stimulates its own uptake and worsening mesangial injury. GLUT-2, encoded by *SLC2A2* gene, is expressed in podocytes and tubular cells and its expression is also increased in DN. The expression of this glucose transporter is regulated by the transcription factor HNF-1 α . Transforming growth factor - β (TGF- β) also participates in renal injury induced by hyperglycemia, exerting several deleterious effects, such as to decrease the activity of matrix metalloproteinases and to promote renal fibrosis. This growth factor determines the transcriptional activation of target genes, but needs other activators and co-activators, such as the protein named SMIF, encoded by the gene *DCP1A*. Given the involvement of the aforementioned proteins in the pathogenesis of DN, the present study aimed to evaluate the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes *SLC2A1*, *SLC2A2*, *HNF1A*, *TGFB1* e *DCP1A* with renal disease in patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM). A total of 449 patients (56.4% female, mean age 36.0 $\pm$ 11.0 years) with disease duration > 10 years were included and grouped according to DN stages: (1) absence of DN: normal urinary albumin excretion (UAE) (< 30 mg/24h or < 20 μ g/min) and plasmatic creatinine < 1.7 mg/dL without antihypertensive treatment; (2) incipient DN: microalbuminuria (UAE 30 – 299 mg/24h or 20 – 199 μ g/min) and plasmatic creatinine < 1.7 mg/dL without antihypertensive treatment and (3) overt DN: macroalbuminúria (UAE > 300 mg/24h or > 200 μ g/min) or proteinuria or renal replacement therapy. Associations of SNPs with estimated glomerular filtration rate (eGFR) were also evaluated. All SNPs were genotyped by real time polymerase chain reaction using fluorescent-labelled probes. Associations of the SNPs with DN were assessed by logistic regression analyses and odds ratios (OR) were calculated after adjustments for possible confounders included as covariables in the regressive model. P values <0.05 (two-tails) were considered significant. The following associations were observed: (1) *SLC2A1*: genotypes CT+TT from rs841848 conferred risk to incipient DN in the overall population (OR 1.88; 95%IC 1.06-3.34; *P*= 0.03) and in the male patients (OR 2.67; CI95% 1.13-6.35; *P*=0.0247) and to overt DN (OR 2.70; CI95% 1.18-6.31; e *P*= 0.0197) only in the male patients; genotypes GA+AA

from rs1385129 conferred risk to overt DN in the male population (OR 3.09; CI95% 1.34-7.25; $P=0.0085$); genotypes AT + TT from rs3820589 conferred protection against incipient DN in the overall population (OR 0.36; CI95% 0.16-0.78; $P=0.0132$) and in the female population (OR 0.14; CI95% 0.02-0.52; $P=0.0122$). (2) SLC2A2: genotypes GA+GG from rs5396 conferred protection against overt DN in the male patients (OR 0.29; CI95% 0.12-0.69; $P=0.0052$); genotypes AG+GG from rs6800180 conferred protection against overt DN in the male patients (OR 0.16; CI95% 0.14-0.90; $P=0.0324$). (3) HNF1A: genotypes AC + CC from rs1169288 conferred risk to overt DN in the overall population (OR 2.23; CI95% 1.16-4.38; $P=0.0175$); genotypes CG+GG from rs1169289 conferred risk to overt DN in the overall population (OR 3.43; CI95% 1.61-7.73; $P=0.002$); (4) TGFB1: genotypes CT + TT from rs1800468 conferred risk to incipient DN in the overall population (OR 2.99; CI95% 1.26-7.02; $P=0.0116$) and the polymorphic allele T from SNP rs1800469 conferred risk to a lower eGFR ($p=0.0271$). (5) DCP1A: the polymorphic allele A from SNP rs11925433 was also associated with a lower eGFR ($p=0.0075$). In conclusion, SNPs in the genes encoding proteins GLUT-1, GLUT-2, HNF-1 α , TGF- β e SMIF, all involved in the pathogenesis of DN, conferred susceptibility to this chronic complication in the T1DM patients evaluated in the present study.

Descriptors: Diabetic Nephropathy, Type 1 Diabetes Mellitus, single nucleotide polymorphism, glucose transporter type 1, glucose transporter type 2, nuclear factor 1-alpha hepatocyte, transforming growth factor beta, Protein smad 4, DCP1A.

1. INTRODUÇÃO

O diabetes melitus tipo 1 (DM1) é uma doença auto-imune caracterizada pela destruição das células beta produtoras de insulina (Liu et al. 2002) que acomete mais comumente crianças e adolescentes, no entanto, o DM1 pode se desenvolver em qualquer faixa etária. Estima-se que acometa aproximadamente 0,3% das populações caucasianas, com pico de início da doença entre os 11 e 12 anos de idade (Milech & Oliveira 2004). Embora a característica básica do DM1 seja a perda da homeostasia glicêmica, sua morbi-mortalidade está relacionada às complicações crônicas degenerativas que acometem territórios tais como rins, olhos, sistema nervoso e cardiovascular, e cujo desenvolvimento está relacionado principalmente ao grau e à duração da hiperglicemia. Além da presença da hiperglicemia e de outros fatores de risco, tais como a hipertensão arterial, a dislipidemia e o tabagismo, existem evidências sugerindo que uma predisposição genética desempenhe um papel na susceptibilidade para as complicações microvasculares (Seaquist et al. 1989; Quinn et al. 1996).

1.1 Nefropatia Diabética

A nefropatia diabética (ND) é uma complicação microvascular do diabetes definida pelo aumento da excreção urinária de albumina na ausência de outras doenças renais e sua presença está associada a um aumento na mortalidade (Gross et al. 2005). A ND é responsável por 28%

dos pacientes em tratamento dialítico no Brasil, segundo censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia (Sesso RC et al. 2012).

A incidência cumulativa da ND incipiente, definida pela presença de microalbuminúria, em portadores de DM1 foi de 12,6% ao longo de 7,3 anos no *European Diabetes (EURODIAB) Prospective Complications Study* (Chaturvedi N et al. 2001) e aproximadamente 33% em um seguimento dinamarquês de duração de 18 anos (Hovind P et al. 2004). A ND franca, caracterizada pela presença de proteinúria, acomete cerca de 15 a 40% dos portadores de DM1, com um pico de incidência ao redor de 15 a 20 anos de doença (Gross et al., 2005).

O desenvolvimento da ND está intimamente relacionado com fatores genéticos e várias evidências demonstram essa participação, como a agregação familiar de nefropatia (Seaquist et al. 1989; Quinn et al. 1996), a concordância da gravidade da glomerulopatia em pacientes de uma mesma família (Fioretto et al. 1999) e a maior susceptibilidade para a ND em portadores de diabetes cujos pais têm hipertensão ou doença cardiovascular, o que sugere que genes relacionados ao controle da pressão arterial (PA) e ao risco cardiovascular também participem da susceptibilidade à ND (Roglic et al. 1998; De Cosmo et al. 1997). A história natural da ND também demonstra a relevância da susceptibilidade genética, pois se a hiperglicemia fosse o único fator de risco, a frequência de ND aumentaria em proporção à duração da doença até que a maioria dos pacientes desenvolvesse essa complicação (Conway et al. 2006). No entanto, o pico de incidência de ND ocorre em 15 a 20 anos após o início do DM1 e diminui

após esse período, com a incidência cumulativa nos estudos mais antigos variando de 25% a 40% após 25 anos de diabetes (Rossing et al. 2005). Sendo assim, apenas uma parcela de pacientes parece ter uma predisposição ao desenvolvimento da ND, ainda que vários apresentem controle glicêmico inadequado.

Polimorfismos de vários genes podem ter uma relação com a patogênese das complicações crônicas do diabetes, como genes relacionados às vias bioquímicas induzidas pela hiperglicemia (os produtos finais de glicação avançada, o aumento na formação de espécies reativas de oxigênio e a atividade aumentada da via da aldose-redutase), genes que codificam proteínas do sistema renina-angiotensina; genes que codificam citocinas, fatores de crescimento e seus receptores e os transportadores de glicose, entre muitos outros (Corrêa-Giannella & Vieira 2008).

1.2 Transportadores de glicose e complicações crônicas do diabetes

A característica comum de todas as células que sofrem os efeitos deletérios da hiperglicemia é a incapacidade de regular para baixo a entrada de glicose em presença de altas concentrações de glicose extracelular (Nishikawa T et al. 2000), o que evidencia a importância do estudo dos transportadores de glicose no contexto do diabetes.

Existem dois mecanismos de transporte de glicose através da membrana celular: transporte facilitado, mediado por transportadores de membrana específicos (GLUTs) e o co-transportador acoplado ao íon sódio

(SGLT) (Brown 2000). Até o momento já foram descritas 14 isoformas de GLUTs (Scheepers et al. 2004).

O transporte de glicose no rim ocorre nas células epiteliais do túbulo contorcido proximal, envolvendo SGLTs e GLUTs. A glicose é transportada através do bordo em escova (luminal) da membrana celular pelos SGLTs, o que requer um gradiente eletroquímico, acumulando-se no citoplasma das células epiteliais. Seu efluxo para o interstício ocorre através de sua membrana basolateral e é mediado pelos GLUTs, de acordo com gradiente de concentração. No segmento S1, SGLT2 e GLUT-2, transportadores de baixa afinidade e alta capacidade estão expressos, de forma que a maior parte da glicose filtrada é reabsorvida nessa região (Wright 2001).

A hiperglicemia e o aumento de glicose intersticial, característicos do DM, reduzem o gradiente de glicose túbulo-sangue, diminuindo seu efluxo das células epiteliais e, conseqüentemente, todo o processo de reabsorção. Portanto, faz-se necessário o aumento da expressão gênica desses transportadores, o que foi relatado na literatura em modelos animais de DM (Chin et al. 1997; Vestri et al. 2001).

1.2.1 Transportador de glicose tipo 1 (GLUT-1)

O transportador de glicose tipo 1 (GLUT-1), codificado pelo gene *SLC2A1*, não tem sua atividade alterada pela presença de insulina, possui alta afinidade pela molécula de glicose e alta capacidade de transporte, mantendo assim as concentrações de glicose dentro da célula. O GLUT-1 apresenta uma ampla distribuição intraglomerular, sendo o principal

transportador de glicose em células mesangiais de camundongos (Zhang et al. 2001) e de seres humanos (Li et al. 2001). Também é detectável em podócitos e em células endoteliais (Heilig et al. 2006).

Em ratos e camundongos, já se demonstrou que a proteína GLUT-1 está aumentada no glomérulo como um todo (Inoki et al. 1999; Nose et al. 2003), e nas células mesangiais, (Brosius et al. 2005) em resposta ao DM ou à exposição a altas concentrações de glicose, respectivamente. O aumento da proteína GLUT-1 também foi observado no córtex renal de ratos após 45 dias de DM, concomitantemente ao desenvolvimento de nefropatia incipiente. Sugeriu-se, portanto, que o aumento da expressão do GLUT-1 poderia amplificar os efeitos da hiperglicemia na promoção de uma alta concentração de glicose intracelular nas células mesangiais, contribuindo para o dano renal induzido pela hiperglicemia (Schaan et al. 2001).

Outros achados experimentais que corroboram a participação do GLUT-1 na patogênese da ND são a ativação de vias bioquímicas deletérias, como a via da proteína cinase C (PKC) e a via dos póliois (Henry DN et al. 1999), classicamente ativadas pela hiperglicemia, e o acúmulo de fibronectina (Weigert C et al. 2003) em células mesangiais que superexpressam o GLUT-1. Todas essas alterações são típicas da ND.

Acredita-se que a expressão do GLUT-1 em células mesangiais possa variar em pacientes com DM1, o que poderia explicar em parte a predisposição de apenas um grupo de pacientes para o desenvolvimento da ND (Hodgkinson et al. 2005) e o que justifica os estudos de variantes genéticas no gene que codifica o GLUT-1 e sua associação com a ND.

Diversos estudos mostraram que o polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) +22999 G/T (rs3754218), localizado no intron 2 do gene do GLUT-1 (*SLC2A1*) está envolvido no desenvolvimento de ND em pacientes com DM tipo 1 e 2 (Gutierrez et al. 1998; Liu et al. 1999; Grzeszczak et al. 2001; Hodgkinson et al. 2001), enquanto o trabalho de Tarnow (Tarnow et al. 2001) não observou associação entre esse SNP e microangiopatia diabética em pacientes com DM1 caucasianos. Esse SNP está fortemente associado ao polimorfismo conhecido como *enhancer-2* (intron 2 do gene *SLC2A1*; rs841847), que está localizado em um provável sítio de ligação ao fator de transcrição USF e que regula a expressão do *SLC2A1* em resposta a altas concentrações de glicose, podendo, dessa forma, ser funcionalmente ativo no controle da expressão da proteína GLUT-1 no DM (Brosius et al. 2005).

O SNP -2841 A/T (rs710218) na região promotora do gene *SLC2A1* também parece conferir susceptibilidade para o desenvolvimento da ND em pacientes com DM1. O alelo T-2841 contribui para o desenvolvimento de ND, enquanto que o alelo A-2841 parece conferir proteção. A combinação dos alelos T-2841 e T+22999 esteve presente em alta frequência em pacientes com ND. Não se sabe se este SNP é funcional, no entanto, devido à sua proximidade com um elemento responsivo à hipóxia (*hypoxia response element*, HRE), especula-se que ele possa modificar a afinidade de ligação ao HIF, fator de transcrição induzível por hipóxia que regula a expressão do GLUT-1 (Hodgkinson et al. 2005). O SNP rs3820589 também está localizado na região promotora do gene *SLC2A1*, mas sua associação com a ND nunca

foi avaliada. A Figura 1 mostra alguns SNPs presentes no gene que codifica o GLUT-1.

Figura 1. Gene *SLC2A1* humano. Localizado no Cromossomo 1p34.2, com 10 exons e 3 enhancers. Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) na região promotora (rs3820589 -1187 A/T), Exon 2 (rs1385129 G/A), Enh2SNP1 (rs841847), Enh2SNP2 (841848) e intron 1 rs12718444.

1.2.2 Transportador de glicose tipo 2 (GLUT-2)

O GLUT-2 é um transportador de baixa afinidade pela glicose, codificado pelo gene *SLC2A2* e expresso predominantemente em células β pancreáticas, fígado, rins e intestino delgado (membrana basolateral). Em todos esses tecidos, a captação de glicose é dependente da concentração da glicose no plasma. No diabetes há um aumento da expressão do GLUT-2 no córtex renal e, acredita-se que isso possa resultar em uma elevação da reabsorção da glicose e maiores concentrações intersticiais da mesma, disponibilizando mais glicose para as células mesangiais, que têm expressão aumentada de GLUT-1. Esse processo poderia acelerar a lesão mesangial (Schaan et al. 2005).

Estudos funcionais para avaliar a região promotora do gene *SLC2A2* revelaram que os SNPs nas posições -269 (A/C, rs5394), -44 (G/A, rs5396) e +103 (T/C rs5393) parecem modular a atividade transcricional desse gene, com os alelos -269 C, + 103G e -44 G diminuindo sua transcrição (Cha et al. 2002).

1.3 HNF1- α

HNF1- α (do inglês, *Hepatocyte nuclear factor 1 alpha*) é um fator de transcrição dimérico expresso predominantemente no fígado, rins, pâncreas e trato digestivo (Ott et al. 1991). A estrutura modular da proteína inclui um domínio de dimerização codificado pelos primeiros 32 aminoácidos, um homeodomínio variante de ligação ao DNA e um domínio de transativação na sua parte C-terminal.

Mutações no gene que codifica essa proteína associam-se a uma forma de diabetes monogênico conhecido por MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*) 3 (Yamagata et al. 1996).

Sabe-se que o HNF-1 α recruta a proteína p300 e ambos ligam-se à região 5' não traduzida (UTR) do *SLC2A2*, indicando que esse fator de transcrição regula a expressão do gene que codifica o GLUT-2 em seres humanos (Ban et al. 2002). Pontoglio et al. mostraram que o HNF1- α controla diretamente a expressão do gene transportador de glicose acoplado a sódio, o *SGLT2*. Juntos, estes dados indicam que HNF1- α desempenha um papel fundamental na homeostase da glicose em mamíferos.

1.4 TGF- β 1

O TGF- β 1 (do Inglês, *Transforming Growth Factor β*) é membro da família de polipeptídeos diméricos de fatores de crescimento, envolvidos com diversos processos regulatórios celulares como diferenciação, angiogênese, apoptose, interação com matriz extracelular, controle de resposta imune e desenvolvimento de fibrose (Blobe et al. 2000).

Esta citocina promove uma reação biológica ligando-se a receptores de membrana (T β RII, T β RIII) que se associam, sofrem fosforilação e ativam o T β RI, que, por sua vez, desencadeia uma cascata de sinalização intracelular mediada pelas proteínas SMADs. Uma vez fosforiladas, essas proteínas são levadas ao núcleo (Massague et al. 1998) (Figura 2).

Existem oito proteínas SMADs distintas distribuídas em três classes funcionais: as R-SMADs (1, 2, 3, 5 e 8, que são diretamente fosforiladas pelo receptor e formam complexos com as Co-SMAD), a Co-SMAD (4, co-mediadora) e as I-SMADs (7 e 8, inibitórias). Os complexos SMADs ativados translocados para o núcleo regulam a expressão de diversos genes-alvo, juntamente com outros fatores nucleares. As I-SMADs regulam negativamente a sinalização do TGF- β por competirem com as R-SMADs (Shi & Massague 2003).

O TGF- β é uma proteína classicamente associada à ND. Vários grupos de pesquisa demonstraram que a expressão de TGF- β está aumentada nos rins de animais diabéticos insulino-dependentes durante os estágios iniciais e finais da doença (Nakamura T et al. 1993, Hill C, et al. 2000) e que o TGF- β é um mediador da hipertrofia renal, glomeruloesclerose

(Ziyadeh et al. 1995) e fibrose tubulointersticial (Iwano et al. 1996) nos rins de pacientes diabéticos. Entre os efeitos deletérios do TGF- β destacam-se: (1) diminuir a atividade de metaloproteinases de matriz (MMP), o que contribui para o acúmulo de matriz no glomérulo; (2) aumentar a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF); (3) promover aumento da fibrose renal; (4) contribuir para a indução de albuminúria por reduzir a captação renal de albumina; (5) aumentar a expressão de interleucina-18 nas células do túbulo proximal e (6) participar da geração de espécies reativas de oxigênio mediada pelo sistema NADPH oxidase (Balakumar et al. 2009).

Figura 2 . Via de sinalização do fator de crescimento transformante β (TGF- β). O TGF- β liga-se ao receptor tipoII (T β RII), diretamente ou através do T β RIII e induz a associação doT β RII ao T β RI. O T β RII fosforila e ativa T β RI, que por sua vez fosforila a Smad2 ou Smad3. As Smads fosforiladas são transportadas para o núcleo, onde ativam a transcrição de genes-alvo. A Smad7 inibe asinalização de TGF- β , impedindo a ativação da Smad2 ou da Smad3 pelo T β RI (Massague et al. 1998).

O polimorfismo – 509 C/T (rs1800469) está localizado na região promotora e a troca do alelo C pelo alelo T modifica uma sequência que afeta a ligação ao fator de transcrição YY1 (Yin Yang-1), o que se associa a uma desregulação na transcrição do gene (Hobbs 1998). Além disso, os carreadores do alelo T apresentam concentrações plasmáticas mais elevadas de TGF- β 1 (Grainger et al. 1999).

Um estudo realizado em caucasianos por Ng et al. avaliou variantes alélicas no gene do TGF- β 1, entre eles os SNPs -800 G/A (rs1800468) e - 509 C/T (rs1800469) em pacientes com DM1, porém não observou associação com a ND.

1.5 DCP1A

Após o estímulo com TGF- β 1, a ativação transcricional não ocorre na ausência da SMAD4 co-mediadora, razão pela qual se acredita que essa SMAD é um ativador transcricional indispensável para a resposta ao TGF- β 1. Sabe-se, entretanto, que a afinidade de ligação das SMADs ao DNA é fraca e pouco específica, de forma a necessitar de co-ativadores específicos. O gene *DCP1A* ou *SMIF* codifica a proteína SMIF (*Smad4-interacting protein*), que se liga especificamente à SMAD4. Esse complexo transloca-se para o núcleo, onde exerce atividade transcricional. Acredita-se que a modificação da expressão da proteína SMIF possa contribuir para doenças nas quais o TGF- β 1 esteja envolvido (Bai et al. 2002).

Não existe na literatura pesquisas que envolvam o gene *SMIF* com a ND, porém por participar da via de sinalização do TGF- β 1 esse gene é um candidato interessante.

2. OBJETIVOS

Estudar a associação dos seguintes polimorfismos de um único nucleotídeo nos genes que codificam as proteínas GLUT-1, GLUT-2, HNF-1 α , TGF- β 1 e DCP1A com a doença renal em portadores de DM1:

- *SLC2A1* (GLUT-1): rs841848 (+21956 C/T), rs841847 (+21793 G/A), rs1385129 (+15535 G/A) e rs3820589 (-1187 A/T);
- *SLC2A2* (GLUT-2): rs6800180 (-3042 A/G) e rs5396 (-44 G/A);
- *HNF1A* : rs1169289 (+73 C/G) e rs1169288 (+101 A/C);
- *TGFB1*: rs1800468 (-800 C/T) e rs1800469 (-509 C/T).
- *DCP1A*: rs3732834 (+56698 G/A) e rs11925433 (+2160 G/A).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Escolha dos SNPs

Os SNPs que nunca haviam sido estudados na literatura (*SLC2A1*: rs3820589; *SLC2A2*: rs6800180; *DCP1A*: rs3732834 e rs11925433) foram selecionados a partir de bancos de dados (por exemplo, <http://variome.kobic.re.kr/SNPatPromoter>, que não está mais disponível para acesso) que descrevem polimorfismos presentes na região promotora ou em regiões regulatórias 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/>). Alguns desses 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.

3.2 Casuística e protocolo clínico

Foram estudados 449 pacientes portadores de DM1 com mais de 10 anos de diagnóstico e controle glicêmico inadequado, acompanhados no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n=216), do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (n=167) e do Ambulatório de Diabetes da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (n=66) no período entre outubro de 2004 a outubro

de 2012. O DM1 foi definido como deficiência absoluta de insulina secundária à destruição auto-imune das células beta pancreáticas na presença de auto-anticorpos contra células beta (anti-insulina, descarboxilase do ácido glutâmico [GAD65], e anti-tirosinas fosfatases [IA-2 e IA-2 β]) (ADA, 2004).

A frequência desses polimorfismos também foi determinada em uma população de 100 indivíduos controles não diabéticos coletados no Serviço de Endocrinologia do Hospital do Servidor Público Estadual (HSPE) para a avaliação do equilíbrio de Hardy-Weinberg (a adição ao estudo dos pacientes controles não diabéticos do HSPE foi aprovada no adendo da Comissão de Ética em 12/10/2010).

Os seguintes dados clínicos foram coletados para os pacientes diabéticos: idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de diagnóstico, controle glicêmico atual e pregresso, história de complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e outras comorbidades como hipertensão arterial sistêmica (HAS, definida como PA superior a 140 x 90 mmHg em, pelo menos, três medidas em posição sentada, ou uso de medicação antihipertensiva) e dislipidemia (triglicérides > 150 mg/dL, lipoproteína de baixa densidade [LDL-c] > 100 mg/dL ou uso de medicação hipolipemiante). Também foram registradas a utilização de inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA), de bloqueadores do receptor da angiotensina II (BRA) e de drogas hipolipemiantes (estatinas e fibratos). Os dados do exame físico registrados foram: peso, estatura e PA.

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

A EUA 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 do colesterol (HDL-c) e triglicérides (TG) foram realizadas pelos respectivos métodos enzimáticos (colorimétrico automatizado). As concentrações de LDL-c 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), 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 HAS, dislipidemia, DM tipo 1 e 2. Após a assinatura do TCLE,

também foram colhidos 10,0 mL de sangue periférico de cada um dos voluntários para extração de DNA genômico de leucócitos.

3.3 Definição da nefropatia diabética

Os pacientes foram classificados de acordo com o *estágio* de ND, conforme definição abaixo:

1. *Ausência de ND*: EUA normal (< 30 mg/g de creatinina ou < 20 $\mu\text{g}/\text{min}$) e creatinina plasmática $< 1,7$ mg/dL sem tratamento antihipertensivo.
2. *ND incipiente*: microalbuminúria (EUA de $30 - 299$ mg/g de creatinina ou $20 - 199$ $\mu\text{g}/\text{min}$) e creatinina plasmática $< 1,7$ mg/dL sem tratamento antihipertensivo.
3. *ND Franca*: macroalbuminúria (EUA > 300 mg/g de creatinina ou > 200 $\mu\text{g}/\text{min}$) ou proteinúria (> 500 mg/24 h) ou terapia de reposição renal (qualquer modalidade de diálise ou transplante renal).

O ritmo de filtração glomerular estimado (RFGe) também foi calculado para todos os pacientes com o uso da fórmula do *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) (Levey et al. 1999). 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. 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 da análise.

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 h 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 ressuspensionado 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 100ng/ 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 espectofotômetro *NanoDrop* (Thermo Scientific).

3.5 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

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

Para preparação da reação de 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 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o uso do programa JMP 9.0 (JMP SAS Institute Inc). Os resultados estão expressos como média $\pm$ DP, exceto quando indicado de outra maneira. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi determinado usando-se a frequência dos alelos com o teste do qui-quadrado (χ^2) de Pearson. As variáveis contínuas que não apresentaram distribuição normal foram transformadas para log 10. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo Teste χ^2 de Fisher e ANOVA para variáveis

categóricas e contínuas, respectivamente. As associações dos SNPs com a ND foram avaliadas por análise de regressão logística e os *odds ratios* (OR) e respectivos intervalos de confiança (IC) de 95% foram calculados após ajuste para possíveis confundidores, que foram incluídos como co-variáveis no modelo de regressão. Valores de $P < 0.05$ (bicaudais) foram considerados significantes.

O poder do estudo foi calculado com o programa CaTS (Skol AD et al. 2006) e foi $> 80\%$ para detectar associações de SNPs (no modelo dominante) com frequências do alelo mais raro de 11% e um risco relativo para o genótipo $\geq 1,45$. O *false-discovery rate* (FDR) corrigido por Benjamini foi utilizado para o Teste de Múltiplas Hipóteses (TMH) (Benjamini Y, et al. 1995).

Pair-wise linkage disequilibrium (D') e os coeficientes de correlação (r^2) foram estimados usando o programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010). O *software* SHEsis foi empregado para a obtenção das frequências dos haplótipos (Li et al. 2009).

4. RESULTADOS

4.1 Análise das características clínicas dos pacientes

A Tabela 1 descreve as características demográficas, clínicas e laboratoriais dos 449 pacientes classificados nos seguintes grupos: ausência de ND, ND incipiente e ND franca.

A proporção de pacientes do sexo masculino foi maior no grupo de pacientes com ND franca em comparação ao grupo sem ND. Os pacientes com ND franca apresentaram pressão sistólica e diastólica mais elevadas, maiores concentrações de colesterol e triglicérides plasmáticos, maior frequência de HAS e menores valores de RFGe que os pacientes com ND incipiente e sem ND. A proporção de pacientes sem retinopatia e com retinopatia proliferativa foi, respectivamente, menor e maior nos pacientes com ND franca.

Tabela 1: Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos portadores de DM1

	Ausência de Nefropatia (n=248)	Nefropatia Incipiente (n=82)	Nefropatia Franca (n=119)	P
Idade (anos)	36 ± 12	36 ± 11	35 ± 9	0,78
Sexo: M/F (%)	38 / 62	46 / 54	51 / 49 ^a	0,04
Idade ao diagnóstico (anos)	14 ± 9	13 ± 7	14 ± 7	0,11
Duração do diabetes (anos)	22 ± 8	24 ± 10	21 ± 6	0,27
HbA1c (%)	8,7 ± 1.9	8,8 ± 1.9	9,0 ± 2.5	0,64
Pressão arterial sistólica (mmHg)	118 ± 15	121 ± 19	131 ± 25 ^{a,b}	<0,0001
Pressão arterial diastólica (mmHg)	76 ± 10	77 ± 11	83 ± 16 ^{a,b}	<0,0001
Colesterol plasmático (mg/dL)	178 ± 36	169 ± 36	196 ± 65 ^{a,b}	0.0012
Triglicérides plasmáticos (mg/dL)	85 ± 51	98 ± 58	138 ± 100 ^{a,b}	<0.001
RFGe (ml/min)	93 ± 27	83 ± 21	50 ± 36 ^{a,b}	<0,0001
Uso de IECA (%)	19	43 ^a	30 ^a	<0,0001
Hipertensão Arterial (%)	34	46	70 ^{a,b}	<0,0001
Estágios de Retinopatia (%)	51 / 24 / 5 / 20	33 / 16 / 6 / 45	6 / 20 / 6 / 68	<0,0001

RFGe: ritmo de filtração glomerular estimado; IECA: enzima conversora da angiotensina.

a: sem nefropatia diabética; b: nefropatia diabética incipiente.

Estágios de retinopatia: ausente/não proliferativa leve/ não proliferativa moderada e grave/ proliferativa.

4.2 Análise das associações entre os SNPs e a nefropatia diabética

A distribuição de todos os SNPs estudados foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Todos os SNPs foram avaliados apenas no modelo dominante, para aumentar o poder estatístico do estudo, uma vez que a frequência de pacientes homozigotos para o alelo polimórfico foi baixa.

4.2.1 Gene *SLC2A1* (GLUT-1)

Quando considerada toda a casuística, observou-se que os genótipos CT+TT do SNP rs841848 conferiram risco significativo para a presença de ND incipiente (OR 1,88; IC95% 1,06-3,34; $P=0,03$). Quando a casuística foi estratificada por sexo, observou-se que os genótipos CT+TT conferiram risco tanto para ND incipiente (OR 2,67; IC95% 1,13-6,35; $P=0,0247$) quanto para a ND franca (OR 2,70; IC95% 1,18-6,31; e $P=0,0197$) apenas nos pacientes do sexo masculino.

Não foram observadas associações entre o SNP rs841847 e o estágio de ND.

Para o SNP rs1385129, observou-se que os genótipos GA+AA conferiram risco para a presença de ND franca apenas na população de portadores de DM1 do sexo masculino (OR 3,09; IC95% 1,34-7,25; $P=0,0085$), não sendo observadas associações na população total.

Para o SNP rs3820589, na análise de toda a casuística observou-se que os genótipos AT + TT conferiram proteção contra a ND incipiente (OR 0,36; IC95% 0,16-0,78; $P=0,0132$). A análise estratificada por sexo também demonstrou que os genótipos AT + TT conferiram proteção contra a ND

incipiente no sexo feminino (OR 0,14; IC95% 0,02-0,52; $P=0,0122$) (Tabela 2).

A frequência de ND incipiente foi significativamente menor nos pacientes portadores dos genótipos protetores do SNP rs3820589 (AT ou TT) e do SNP rs841848 (CC) concomitantemente em comparação aos pacientes que não apresentavam nenhum desses genótipos (16,9% vs 33,3%, OR 0,31; IC95% 0,11-0,80; $P=0,0197$ após ajuste para as variáveis: idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de DM, sexo, HAS, colesterol total e retinopatia).

A análise do desequilíbrio de ligação (DL) entre os SNPs do gene *SLC2A1* revelou que apenas um par de SNPs (rs841847 e rs841848) apresentou tanto um valor de $D' > 0,8$ (0,8752) quanto um valor de $P < 0,05$ ($<0,0001$), no entanto, o valor do r^2 foi baixo (0,055).

A análise dos haplótipos formados pelos quatro SNPs do gene *SLC2A1* demonstrou que a frequência do haplótipo AGGT (rs3820589-A, rs1385129-G, rs841847-G, rs841848-T) foi significativamente mais alta nos pacientes com ND incipiente em comparação aos pacientes sem ND (9,6% vs 3,7%; $P=0,0068$; OR 2,54; IC95% 1,26-5,12) enquanto a frequência do haplótipo AGGC (rs3820589-A, rs1385129-G, rs841847-G, rs841848-C) foi significativamente mais alta nos pacientes sem ND em comparação aos pacientes com ND incipiente (52,6% vs 46,2%; $P=0,0278$; OR 0,66; IC95% 0,46-0,95).

Tabela 2: Distribuição das frequências dos genótipos conforme o *estágio* da nefropatia diabética e o *odds ratio* para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo no gene *SLC2A1* (GLUT-1).

<i>SLC2A1</i>	Ausência de Nefropatia (n=246)	Nefropatia Incipiente (n=82)	Nefropatia Franca (n=118)	OR (IC95%) para Nefropatia Incipiente	<i>P</i>	OR (IC95%) para Nefropatia Franca	<i>P</i>
rs841848							
População Total							
CC	0,669	0,598	0,610				
CT	0,290	0,353	0,381	1,88 (1,06 – 3,34)	0,03	1,58 (0,89 – 2,81)	0,11
TT	0,041	0,049	0,009				
Mulheres							
CC	0,645	0,614	0,684				
CT	0,316	0,318	0,316	1,47 (0,67 – 3,16)	0,33	0,99 (0,44 – 2,18)	0,98
TT	0,039	0,068	0,000				
Homens							
CC	0,710	0,579	0,541				
CT	0,247	0,395	0,443	2,67 (1,13 – 6,35)	0,0247	2,70 (1,18 – 6,31)	0,0197
TT	0,043	0,026	0,016				

OR (*odds ratio*) em um modelo dominante de regressão logística ajustada para idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de DM, sexo, HAS, colesterol total e retinopatia

Tabela 2 (Continuação): Distribuição das frequências dos genótipos conforme o estágio da nefropatia diabética e o odds ratio para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo no gene *SLC2A1* (GLUT-1).

<i>SLC2A1</i>	Ausência de Nefropatia (n=246)	Nefropatia Incipiente (n=82)	Nefropatia Franca (n=118)	OR (IC95%) para Nefropatia Incipiente	<i>P</i>	OR (IC95%) para Nefropatia Franca	<i>P</i>
rs841847							
População Total							
GG	0,605	0,585	0,588				
GA	0,354	0,366	0,336	0,89 (0,50 – 1,58)	0,68	0,95 (0,55 – 1,66)	0,87
AA	0,041	0,049	0,076				
Mulheres							
GG	0,621	0,614	0,603				
GA	0,340	0,318	0,276	0,88 (0,39 – 1,87)	0,72	1,03 (0,48 – 2,23)	0,93
AA	0,039	0,068	0,120				
Homens							
GG	0,581	0,553	0,574				
GA	0,376	0,421	0,393	0,91 (0,40 – 2,05)	0,82	0,88 (0,39 – 1,94)	0,74
AA	0,043	0,026	0,033				

OR (*odds ratio*) em um modelo dominante de regressão logística ajustada para idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de DM, sexo, HAS, colesterol total e retinopatia

Tabela 2 (Continuação): Distribuição das frequências dos genótipos conforme o estágio da nefropatia diabética e o *odds ratio* para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo no gene *SLC2A1* (GLUT-1).

<i>SLC2A1</i>	Ausência de Nefropatia (n=246)	Nefropatia Incipiente (n=82)	Nefropatia Franca (n=118)	OR (IC95%) para Nefropatia Incipiente	<i>P</i>	OR (IC95%) para Nefropatia Franca	<i>P</i>
rs1385129							
População Total							
GG	0,616	0,646	0,605				
GA	0,348	0,317	0,387	1,05 (0,58 – 1,86)	0,87	1,37 (0,78 – 2,41)	0,27
AA	0,036	0,037	0,008				
Mulheres							
GG	0,595	0,591	0,672				
GA	0,353	0,364	0,328	0,91 (0,42 – 1,95)	0,83	0,68 (0,67 – 3,21)	0,34
AA	0,052	0,045	0,000				
Homens							
GG	0,649	0,711	0,541				
GA	0,340	0,263	0,443	1,32 (0,53 – 3,17)	0,53	3,09 (1,34 – 7,25)	0,0085
AA	0,011	0,026	0,016				

OR (*odds ratio*) em um modelo dominante de regressão logística ajustada para idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de DM, sexo, HAS, colesterol total e retinopatia

Tabela 2 (Continuação): Distribuição das frequências dos genótipos conforme o estágio da nefropatia diabética e o *odds ratio* para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo no gene *SLC2A1* (GLUT-1).

<i>SLC2A1</i>	Ausência de Nefropatia (n=246)	Nefropatia Incipiente (n=82)	Nefropatia Franca (n=118)	OR (IC95%) para Nefropatia Incipiente	<i>P</i>	OR (IC95%) para Nefropatia Franca	<i>P</i>
rs3820589							
População Total							
AA	0,750	0,878	0,823				
AT	0,238	0,110	0,151	0,36 (0,16 – 0,78)	0,0132	0,58 (0,29 – 1,13)	0,11
TT	0,012	0,012	0,026				
Mulheres							
AA	0,747	0,955	0,828				
AT	0,240	0,045	0,155	0,14 (0,02 – 0,52)	0,0122	0,42 (0,16 – 1,05)	0,07
TT	0,013	0,000	0,017				
Homens							
AA	0,755	0,790	0,820				
AT	0,234	0,184	0,147	0,69 (0,24 – 1,80)	0,46	0,85 (0,31 – 2,24)	0,74
TT	0,011	0,026	0,033				

OR (*odds ratio*) em um modelo dominante de regressão logística ajustada para idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de DM, sexo, HAS, colesterol total e retinopatia

4.2.2 Gene *SLC2A2* (GLUT-2)

A distribuição dos genótipos do SNP rs5396 não foi significativamente diferente entre os grupos, quando considerada toda a casuística. Na análise da casuística estratificada por sexo, os genótipos GA+GG conferiram proteção contra ND franca apenas nos pacientes do sexo masculino (OR 0,29; IC95% 0,12-0,69; $P=0,0052$).

Para o SNP rs6800180 a distribuição dos genótipos também não foi significativamente diferente entre os grupos quando considerada toda a casuística. Na análise da casuística estratificada por sexo, os genótipos AG+GG conferiram proteção contra a ND franca nos pacientes do sexo masculino (OR 0,16; IC95% 0,14-0,90; $P=0,0324$) (Tabela 3).

A análise do DL entre rs5396 e rs6800180 demonstrou valores de $D' = 0,99$, $P < 0,0001$ e $r^2 = 0,39$, sugerindo que esses SNPs estejam em DL. Não foram encontradas associações da ND com nenhum dos haplótipos formados pela combinação dos alelos desses SNPs.

Tabela 3: Distribuição das frequências dos genótipos conforme o estágio da nefropatia diabética e o *odds ratio* para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo do gene *SLC2A2* (GLUT-2).

<i>SLC2A2</i>	Ausência de Nefropatia (n=246)	Nefropatia Incipiente (n=82)	Nefropatia Franca (n=118)	OR (95% IC) para Nefropatia Incipiente	<i>P</i>	OR (95% IC) para Nefropatia Franca	<i>P</i>
rs5396							
População Total							
GG	0,138	0,123	0,126				
GA	0,460	0,481	0,462	0,81 (0,45 – 1,45)	0,48	0,72 (0,41 – 1,28)	0,27
AA	0,402	0,395	0,412				
Mulheres							
GG	0,118	0,093	0,103				
GA	0,431	0,395	0,552	0,71 (0,32 – 1,55)	0,39	1,61 (0,74 – 3,58)	0,23
AA	0,451	0,512	0,345				
Homens							
GG	0,172	0,158	0,148				
GA	0,505	0,579	0,377	0,87 (0,35 – 2,24)	0,77	0,29 (0,12 – 0,69)	0,0052
AA	0,323	0,263	0,475				

OR (*odds ratio*) em um modelo dominante de regressão logística ajustada para idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de DM, sexo, HAS, colesterol total, retinopatia, HDL, HbA1c e uso de IECA.

Tabela 3 (Continuação): Distribuição das frequências dos genótipos conforme o estágio da nefropatia diabética e o *odds ratio* para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo do gene *SLC2A2* (GLUT-2).

<i>SLC2A2</i>	Ausência de Nefropatia (n=246)	Nefropatia Incipiente (n=82)	Nefropatia Franca (n=118)	OR (95% IC) para Nefropatia Incipiente	<i>P</i>	OR (95% IC) para Nefropatia Franca	<i>P</i>
rs6800180							
População Total							
AA	0,682	0,630	0,695				
AG	0,278	0,333	0,254	1,05 (0,57 – 1,92)	0,86	0,58 (0,31 – 1,07)	0,08
GG	0,040	0,037	0,051				
Mulheres							
AA	0,691	0,773	0,667				
AG	0,270	0,204	0,298	0,57 (0,22 – 1,39)	0,24	0,92 (0,39 – 2,12)	0,84
GG	0,039	0,023	0,035				
Homens							
AA	0,667	0,459	0,721				
AG	0,290	0,487	0,213	1,85 (0,78 – 4,44)	0,16	0,37 (0,14 – 0,90)	0,0324
GG	0,043	0,054	0,066				

OR (*odds ratio*) em um modelo dominante de regressão logística ajustada para idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de DM, sexo, HAS, colesterol total, retinopatia, HDL, HbA1c e uso de IECA.

4.2.3 Gene *HNF1A* (HNF1- α)

A análise do polimorfismo rs1169288 no gene *HNF1A* evidenciou que os genótipos AC + CC conferiram risco para ND franca na população total (OR 2,23; IC95% 1,16-4,38; $P=0,0175$).

A análise do polimorfismo rs1169289 também evidenciou que os genótipos CG+GG conferiram risco para ND franca na população total (OR 3,43; IC95% 1,61-7,73; $P=0,002$) (Tabela 4).

A análise do DL entre rs1169288 e rs1169289 demonstrou valores de $D' = 0,67$, $P<0,0001$ e $r^2 = 0,23$, sugerindo um DL moderado. Não foram encontradas associações da ND com nenhum dos haplótipos formados pela combinação dos alelos desses SNPs.

Tabela 4: Distribuição das frequências dos genótipos conforme o estágio da nefropatia diabética e o *odds ratio* para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo no gene *HNF1A* (HNF-1 α).

<i>HNF1A</i>	Ausência de Nefropatia (n=246)	Nefropatia Incipiente (n=82)	Nefropatia Franca (n=118)	OR (95% IC) para Nefropatia Incipiente	<i>P</i>	OR (95% IC) para Nefropatia Franca	<i>P</i>
rs1169288							
População Total							
AA	0,521	0,427	0,470				
AC	0,377	0,463	0,429	1,57 (0,86 – 2,88)	0,14	2,23 (1,16 – 4,38)	0,0175
CC	0,102	0,110	0,101				
rs1169289							
População Total							
GG	0,297	0,280	0,237				
GC	0,488	0,537	0,526	1,30 (0,68 – 2,54)	0,43	3,43 (1,61 – 7,73)	0,002
CC	0,215	0,183	0,237				

OR (*odds ratio*) em um modelo dominante de regressão logística ajustada para idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de DM, sexo, HAS, retinopatia, HbA1c, uso de hipolipemiante, IMC e triglicérides

4.2.4 Gene *TGFB1* (TGF- β 1)

A análise do polimorfismo rs1800468 no gene *TGFB1* evidenciou que os genótipos CT + TT conferiram risco para ND incipiente na população total (OR 2,99; IC95% 1,26-7,02; $P = 0,0116$).

A análise do SNP rs1800469 não evidenciou diferenças significantes entre as frequências dos genótipos e o estágio da ND (Tabela 5).

A análise do DL entre rs1800468 e rs1800469 demonstrou valores de $D' = 0,85$, $P < 0,0001$ e $r^2 = 0,27$. Não foram encontradas associações da ND com nenhum dos haplótipos formados pela combinação dos alelos desses SNPs.

Tabela 5: Distribuição das frequências dos genótipos conforme o estágio da nefropatia diabética e o *odds ratio* para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo no gene *TGFB1* (TGF- β 1)

<i>TGFB1</i>	Ausência de Nefropatia (n=246)	Nefropatia Incipiente (n=82)	Nefropatia Franca (n=120)	OR (95% IC) para Nefropatia Incipiente	<i>P</i>	OR (95% IC) para Nefropatia Franca	<i>P</i>
rs1800468							
População Total							
CC	0,894	0,829	0,892				
CT	0,106	0,159	0,108	2,99 (1,26 – 7,02)	0,0116	1,28 (0,42 – 3,75)	0,65
TT	0,000	0,012	0,000				
OR (odds ratio) em um modelo dominante de regressão logística ajustada para idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de DM, sexo, uso de hipolipemiante, IMC e triglicérides, HbA1c, retinopatia e uso de IECA.							

Tabela 5 (Continuação): Distribuição das frequências dos genótipos conforme o estágio da nefropatia diabética e o *odds ratio* para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo no gene *TGFB1* (TGF- β 1)

TGFB1	Ausência de Nefropatia (n=246)	Nefropatia Incipiente (n=82)	Nefropatia Franca (n=120)	OR (95% IC) para Nefropatia Incipiente	P	OR (95% IC) para Nefropatia Franca	P
rs1800469							
População Total							
CC	0,386	0,427	0,442				
CT	0,455	0,415	0,425	1,13 (0,62 – 2,11)	0,69	1,47 (0,77 – 2,83)	0,24
TT	0,159	0,158	0,133				
Mulheres							
CC	0,372	0,432	0,423				
CT	0,471	0,432	0,458	1,03 (0,46 – 2,35)	0,95	1,70 (0,71 – 4,17)	0,24
TT	0,157	0,138	0,119				
Homens							
CC	0,409	0,421	0,459				
CT	0,430	0,395	0,393	1,28 (0,50 – 3,33)	0,61	1,26 (0,49 – 3,27)	0,63
TT	0,161	0,184	0,148				

OR (odds ratio) em um modelo dominante de regressão logística ajustada para idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de DM, sexo, uso de hipolipemiante, IMC e triglicérides, HbA1c, retinopatia e uso de IECA.

4.2.5 Gene *DCP1A* (SMIF)

As análises dos SNPs rs11925433 e rs3732834 no gene *DCP1A* não evidenciaram diferenças significantes entre as frequências dos genótipos e o estágio da ND (Tabela 6).

A análise do DL entre rs11925433 e rs3732834 demonstrou valores de $D' = 1,0$ $P = 0,0002$ e $r^2 = 0,02$. Não foram encontradas associações da ND com nenhum dos haplótipos formados pela combinação dos alelos desses SNPs.

Tabela 6: Distribuição das frequências dos genótipos conforme o estágio da nefropatia diabética e o *odds ratio* para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo no gene *DCP1A*(SMIF).

<i>DCPIA</i>	Ausência de Nefropatia (n=246)	Nefropatia Incipiente (n=82)	Nefropatia Franca (n=119)	OR (95% IC) para Nefropatia Incipiente	<i>P</i>	OR (95% IC) para Nefropatia Franca	<i>P</i>
rs3732834							
População Total							
GG	0,414	0,444	0,395				
GA	0,455	0,420	0,471	1,10 (0,62 – 1,97)	0,73	1,14 (0,63 – 2,08)	0,67
AA	0,131	0,136	0,134				
Mulheres							
GG	0,392	0,364	0,390				
GA	0,464	0,545	0,474	1,42 (0,65 – 3,22)	0,38	1,00 (0,44 – 2,24)	0,99
AA	0,144	0,091	0,136				
Homens							
GG	0,450	0,541	0,400				
GA	0,440	0,270	0,467	1,21 (0,35 – 1,95)	0,65	1,25 (0,53 – 2,97)	0,60
AA	0,110	0,189	0,133				

OR (*odds ratio*) em um modelo dominante de regressão logística ajustada para idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de DM, sexo, HAS, uso de hipolipemiante, IMC e triglicérides

Tabela 6 (Continuação): Distribuição das frequências dos genótipos conforme o estágio da nefropatia diabética e o *odds ratio* para a associação com os polimorfismos de um único nucleotídeo no gene *DCP1A*(SMIF).

<i>DCP1A</i>	Ausência de Nefropatia (n=246)	Nefropatia Incipiente (n=82)	Nefropatia Franca (n=119)	OR (95% IC) para Nefropatia Incipiente	<i>P</i>	OR (95% IC) para Nefropatia Franca	<i>P</i>
rs11925433							
População Total							
GG	0,943	0,941	0,963				
GA	0,057	0,059	0,025	0,16 (0,01 – 0,84)	0,08	0,47 (0,12 – 1,53)	0,23
AA	0,000	0,000	0,012				

OR (*odds ratio*) em um modelo dominante de regressão logística ajustada para idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de DM, sexo, HAS, uso de hipolipemiante, IMC e triglicérides

4.3 Análise das associações entre os SNPs e o RFGe

Os polimorfismos que apresentaram associação com o RFGe estão descritos na Tabela 7. Para o polimorfismo rs1800469 do gene *TGFB1*, observou-se que o alelo polimórfico T conferiu risco para um menor RFGe ($p=0,0271$), assim como o alelo polimórfico A do SNP rs11925433 do gene *DCP1A* ($p=0,0075$).

Tabela 7: Distribuição das frequências dos genótipos conforme o ritmo de filtração glomerular estimado

População Geral	
rs1800469 (<i>TGFB1</i>) [#]	Ritmo de filtração glomerular estimado
CC	77,92 ± 2,26
CT ou TT	79,58±2,22
Valor de <i>P</i>	0,0271
rs11925433 (<i>DCP1A</i>) [*]	
GG	79,33 ± 1,62
GA ou AA	72,44 ± 8,88
Valor de <i>P</i>	0,0075

[#]ANCOVA ajustada para sexo, idade, idade ao diagnóstico, tempo de DM, uso de hipolipemiante, IMC uso de IECA, retinopatia e colesterol total.

^{*} ANCOVA ajustada para sexo, idade, idade ao diagnóstico, tempo de DM, PAS, PAD, colesterol total, uso de hipolipemiante e HbA1c . Resultados expressos como Média ± SEM.

4.4 Valores de *P* ajustados pelo Teste de Múltiplas Hipóteses

Todos os valores de *P* obtidos nas análises das associações com o estágio da ND e com o RFGe permaneceram significantes após a realização do *false-discovery rate* (FDR) corrigido por Benjamini, conforme evidenciado na Tabela 8.

Tabela 8: Valores de *P* obtidos na regressão logística e após a correção (Teste de Múltiplas Hipóteses [TMH])

Polimorfismo; estágio da ND; População	Valor de <i>P</i> obtido na regressão logística	Valor de <i>P</i> corrigido pelo TMH
<i>SLC2A2</i> rs6800180; ND franca; Sexo masculino	0,0324	
<i>SLC2A1</i> rs841848; ND incipiente; Geral	0,03	0,0325
<i>TGFB1</i> rs1800469; RFG; Geral	0,0271	0,0320
<i>SLC2A1</i> rs841848; ND incipiente; Sexo masculino	0,0247	0,0321
<i>SLC2A1</i> rs841848; ND franca; Sexo masculino	0,0197	0,0285
<i>HNF1A</i> rs1169288; ND franca; Sexo masculino	0,0175	0,0284
<i>SLC2A1</i> rs3820589; ND incipiente; Geral	0,0132	0,0245
<i>SLC2A1</i> rs3820589; ND incipiente; Sexo Feminino	0,0122	0,0264
<i>TGFβ1</i> rs1800468; ND incipiente; Geral	0,0116	0,0302
<i>SLC2A1</i> rs1385129; ND franca, Sexo masculino	0,0085	0,0276
<i>DCP1A</i> rs11925433; RFG; Geral	0,0075	0,0325
<i>SLC2A2</i> rs5396; ND franca; Sexo masculino	0,0052	0,0338
<i>HNF1A</i> rs1169289; ND franca; Sexo masculino	0,002	0,0260

ND: nefropatia diabética; RFG: ritmo de filtração glomerular estimado

5. DISCUSSÃO

As complicações diabéticas microvasculares se constituem nas principais causas de amaurose, doença renal terminal e neuropatias debilitantes. O estudo dos fatores genéticos de suscetibilidade a essas complicações pode ser importante para a identificação de indivíduos sob maior risco, para os quais o controle da glicemia e dos demais fatores de risco poderia ser intensificado. Além disso, a identificação de novos marcadores genéticos também pode elucidar novos mecanismos fisiopatológicos associados ao aparecimento das complicações e, até, contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Klemm & Paschke 2000).

No presente estudo, utilizamos a estratégia do gene candidato, selecionando SNPs em genes envolvidos (*SLC2A1*, *SLC2A2* e *TGFB1*) ou potencialmente envolvidos (*HNF1A* e *DCP1A*) na patogênese da ND.

Em relação ao gene *SLC2A1*, mesmo com uma grande heterogeneidade entre os diferentes estudos, uma recente meta-análise avaliou a associação de cinco SNPs com ND e concluiu que quatro deles parecem conferir susceptibilidade a esta complicação crônica: rs841853 (XbaI), rs841847 (Enh2-1), rs841848 (Enh2-2) e rs1385129 (HaeIII) (Cui et al. 2012). No presente estudo, três desses SNPs (rs841847, rs841848 e rs1385129) e outro nunca antes investigado na ND (rs3820589) foram avaliados pela primeira vez em portadores de DM1 brasileiros.

Os SNPs rs841847 e rs841848 estão localizados na *enhancer 2* (no intron 2 de *SLC2A1*) (Ng et al. 2002), originalmente descrita no gene de camundongo como um elemento que, juntamente com o *enhancer 1* (na região 5') aumenta a atividade de transcrição do gene (Murakami et al. 1992). Estes SNPs estão localizados em uma região E-box (CCCATG), em um potencial sítio responsivo à glicose, onde podem se ligar fatores de transcrição USF (Heilig et al. 2006). Ng et al. avaliaram ambos SNPs em pacientes com DM1 e encontraram que a homozigose para o alelo A no rs841847 foi associada com ND (OR 2,38), enquanto que nenhuma associação foi observada com o rs841848 (Ng et al. 2002). Embora a distribuição dos genótipos de ambos SNPs não pareça diferir muito entre a população caucasiana estudada por Ng e a população brasileira do presente estudo, os resultados observados foram distintos, pois não detectamos nenhuma associação de ND com o SNP rs841847, enquanto os genótipos CT + TT do rs841848 conferiram risco para a ND incipiente (OR 1,88). Além disso, também encontramos uma associação do SNP rs1385129 com ND franca nos pacientes do sexo masculino, enquanto Ng et al. não encontraram associações com esse SNP. Os resultados discordantes entre estes dois estudos realizados em pacientes com DM1 podem ser explicados pelas diferenças inerentes às populações avaliadas.

A associação com a ND foi detectada apenas para o rs841848, apesar da análise do DL com o SNP rs841847 mostrar um $D' > 0,8$, sugestivo de um forte desequilíbrio de ligação (DL) entre os dois SNPs. O valor de r^2 , no entanto, foi muito baixo (0,0555), o que torna difícil determinar a

verdadeira intensidade da ligação entre os SNPs. Esse fato possivelmente reflete uma frequência do alelo mais raro $<0,3$, já que o valor de r^2 depende da frequência do alelo (VanLiere et al. 2008).

O alelo T do SNP rs3820589 conferiu proteção contra ND incipiente na população geral e na população feminina. De acordo com a base de dados do *site Transcriptional Start Sites*, este SNP está localizado na posição -1197 em relação ao sítio de iniciação da transcrição do *SLC2A1* (http://dbtss_old.hgc.jp/hg17), e as frequências alélicas observadas nos pacientes brasileiros (alelo A: 0,89, alelo T: 0,11) são semelhantes às aquelas relatadas na amostra representativa de Caucasianos Europeus (CEU) genotipados no projeto *1000genomes* (alelo A: 0,867, o alelo T: 0,133). Se este SNP é funcional ou está em DL com outra variante funcional ainda não é sabido. Uma análise do rs3820589 no *HapMap* não o incluiu em nenhum bloco de haplótipo na população CEU, no entanto, não podemos excluir que este SNP esteja em DL com outras variantes, uma vez que o *HapMap* é um painel de referência incompleta, especialmente para SNPs incomuns (Zeggini et al. 2005).

A análise de haplótipos em relação a ND incipiente demonstrou que o haplótipo de risco AGGT e o haplótipo de proteção AGGC diferem apenas pelo alelo do SNP rs841848. Embora esses dados possam sugerir que apenas esse SNP determine o risco para DN incipiente, quando foi realizada a análise do diplótipos considerando apenas os dois SNPs que foram positivamente associado com DN (rs3820589 e rs841848), os potenciais haplótipos de proteção e de risco não apresentaram associação com a ND,

sugerindo uma possível participação dos outros dois SNPs estudados. Contudo, uma explicação alternativa para o resultado negativo na análise dos diplótipos é a baixa frequência do alelo protetor rs3820589-T, uma vez que, quando os pacientes portadores dos genótipos protetores de ambos os SNPs concomitantemente foram comparados com os que não carregam nenhum desses genótipos, um efeito protetor contra ND incipiente foi demonstrado (OR 0,31).

O SNP rs5396 no gene *SLC2A2* nunca havia sido estudado na ND, apenas em portadores de DM2, mas não se evidenciou associação entre ele e a predisposição genética para essa doença (Moller 2001). No presente estudo, o alelo polimórfico A foi identificado como um fator de risco para ND franca na população do sexo masculino. É possível que esse polimorfismo seja funcional, já que em um estudo prévio observou-se uma redução na expressão do gene *SLC2A2* em ilhotas pancreáticas de portadores do alelo G (Cha et al. 2002). Poderíamos especular que pacientes portadores dos genótipos GA ou GG estariam mais protegidos da ND por apresentarem menor expressão renal de GLUT-2 que os portadores do genótipo AA, mas não conhecemos mecanismos que pudessem explicar a proteção encontrada apenas para o sexo masculino.

O SNP rs6800180 no gene *SLC2A2* também nunca havia sido estudado na ND e os resultados da análise na população masculina revelaram um papel protetor dos genótipos AG e GG. Como esse SNP está em DL com o rs5396, é possível que sua associação positiva com a ND

franca nos pacientes do sexo masculino apenas reflita a associação do SNP rs5396, ou vice-versa.

Uma forma de diabetes monogênico conhecido por MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*) 3 é causada por mutações no fator de transcrição HNF-1 α . Pacientes com essa condição apresentam deficiência na reabsorção renal de glicose devido à redução na expressão tubular de GLUT-2 e de SGLT-2 (Isomaa et al. 1998). O fato do HNF-1 α regular a expressão do GLUT-2 justificou sua escolha no presente estudo. Os dois polimorfismos selecionados conferiram risco para a ND franca.

O rs1169288 é um SNP não sinônimo (I27L) que já foi associado com risco de progressão para o DM tipo 2 em pacientes idosos e obesos e seu efeito funcional já foi demonstrado em estudos *in vitro*: utilizando-se a região promotora do GLUT-2 como gene repórter, células expressando HNF-1 α contendo a leucina na posição 27 (correspondente ao alelo polimórfico C) promovem uma menor atividade transcricional do GLUT-2 (Holmkvist et al. 2006). Esses resultados, no entanto, não explicariam nossos achados, pois os genótipos contendo o alelo C conferiram risco para a ND franca, enquanto poderíamos supor que a menor expressão renal de GLUT-2 seria mais benéfica do que deletéria. Não podemos afirmar, no entanto, que os resultados obtidos nos experimentos de transfecção *in vitro* reflitam a situação na célula renal *in vivo*.

O SNP rs1169289 nunca havia sido estudado antes em nenhuma condição clínica e é possível que a associação observada na população

masculina, na qual os genótipos GC e CC conferiram risco para a ND franca, reflita o moderado DL existente entre ele e o rs1169288.

A inclusão de SNPs no gene *TGFB1* é justificada por sua extensa participação na lesão renal diabética (Hills C & Squires et al. 2011). Encontramos associação do SNP rs1800468 (genótipos CT e TT) com a ND incipiente e do SNP rs1800469 com o RFGe. Um trabalho realizado numa coorte mexicana não observou associação entre o SNP rs1800468 e ND (Valladares-Salgado et al. 2010), mas achados de um outro estudo demonstram que os carreadores do alelo T apresentam concentrações plasmáticas mais elevadas de TGF- β 1 (Grainger et al. 1999), o que poderia explicar a maior susceptibilidade para ND nos portadores do alelo T, embora estudos adicionais sejam necessários para determinar se a expressão renal do TGF- β 1 difere entre portadores dos diferentes genótipos desse polimorfismo.

Polimorfismos no *DCP1A* foram selecionados por esse gene codificar a proteína SMIF, ou *Smad4-interacting protein*, que se liga à SMAD4, formando um complexo que ativa a transcrição gênica após a ligação do TGF- β 1 a seus receptores (Bai et al. 2002). Não encontramos estudos que tenham avaliado a associação de SNPs nesse gene com qualquer condição clínica. Um dos polimorfismos selecionados (rs11925433) associou-se com o RFGe, da mesma forma que um dos polimorfismos estudados para o gene *TGFB1*. Embora as diferenças no RFGe entre pacientes com e sem as variantes de risco para os SNPs rs11925433 do *DCP1A* e rs1800469 do *TGFB1* pareçam pequenas do ponto de vista

clínico, deve-se ressaltar que a ND é uma condição poligênica, na qual inúmeros SNPs devem estar envolvidos, cada um deles com uma participação pequena e sofrendo as influências não apenas de outros genes como de fatores ambientais.

Com exceção dos SNPs presentes no gene que codifica o GLUT-1, a maioria dos polimorfismos avaliada nesse estudo nunca foi estudada na ND. Por essa razão, investigações adicionais em outras populações devem ser realizadas para a validação dos resultados observados, embora resultados negativos em outras coortes não afastem a participação desses SNPs na nossa população.

6. CONCLUSÕES

Dentre os polimorfismos de um único nucleotídeo selecionados para serem avaliados no presente estudo, os seguintes associaram-se com a nefropatia na população de portadores de DM tipo 1:

- SNPs rs841848, rs1385129 e rs3820589 no gene *SLC2A1*, que codifica o GLUT-1;
- SNPs rs6800180 e rs5396 no gene *SLC2A2*, que codifica o GLUT-2;
- SNPs rs1169289 e rs1169288 no gene *HNF1A*, que codifica o fator de transcrição HNF-1 α ;
- SNPs rs1800468 e rs1800469 no gene *TGFB1*, que codifica o TGF- β ;
- SNP rs11925433 no gene *DCP1A*, que codifica a proteína SMIF.

7. REFERÊNCIAS

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2004;27(1):5-10.

Bai RY, Koester C, Ouyang T, Hahn S, Hammerschmidt M, Peschel C, and Duyster J. SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGF β signalling. *Nat. Cell Biol.* 2002;4(3):181–190.

Balakumar P, Arora MK, Reddy J, Anand-Srivastava MB. Pathophysiology of diabetic nephropathy: involvement of multifaceted signalling mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009;54(2):129-38

Ban N, Yamada Y, Someya Y, Miyawaki K, Ihara Y, Hosokawa M, et al. Hepatocyte nuclear factor-1 α recruits the transcriptional co-activator p300 on the GLUT2 gene promoter. *Diabetes*. 2002;51(5):1409-18.

Benjamini Y, Hochberg Y: Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1995;57(1):289-300.

Blobe G, Schiemann W, Lodish H. Role of Transforming Growth Factor β in Human Disease. *N Engl J Med*. 2000;342(18):1350-1358.

Brosius FC, Heilig CW. Glucose transporter in diabetic nephropathy. *Pediatric Nephrol.* 2005;20(4):447-451.

Brown G. K. "Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency." *J Inherit Metab Dis.* 2000;23(3):237-46.

Cha JY, Kim HS, Kim HI, Im SS, Kim SY, Kim JW, et al. Analysis of Polymorphism of the GLUT2 Promoter in NIDDM Patients and its Functional Consequence to the Promoter Activity. *Ann Clin Lab Sci.* 2002;32(2):114-22.

Chaturvedi N, Bandinelli S, Mangili R, Penno G, Rottiers RE, Fuller JH. Microalbuminuria in type 1 diabetes: rates, risk factors and glycemic threshold. *Kidney Int.* 2001;60(1):219-277.

Chin E, Zamah AM, Landau D, Gronbcek H, Flyvbjerg A, Leroith D, Bondy CA. Changes in facilitative glucose transporter messenger ribonucleic acid levels in the diabetic rat kidney. *Endocrinology.* 1997;138(3):1267-1275.

Conway BR, Savage DA, Maxwell AP. Identifying genes for diabetic nephropathy- current difficulties and future directions. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;48:1439-44.

Corrêa-Giannella ML, Vieira SM. A Predisposição Genética para o Desenvolvimento da Microangiopatia no DM1. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008;52(2):375-386.

Cui W, Du B, Zhou W, Jia Y, Sun G, Sun J, Zhang D, Yuan H, Xu F, Lu X, Luo P, Miao L. Relationship between five GLUT1 gene single nucleotide polymorphisms and diabetic nephropathy: a systematic review and meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2012 Aug;39(8):8551-8

De Cosmo S, Bacci S, Piras GP, Cignarelli M, Placentino G, Margaglione M. High prevalence of risk factors for cardiovascular disease in parents of IDM patients with microalbuminuria. *Diabetologia*. 1997;40(10):1191-6.

Excoffier & Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10:564-7.

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.

Grainger D, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp P, Metcalfe J, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type β 1. *Hum Mol Genet*. 1999;8(1):93–97.

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.

Grzeszczak W, Moczulski DK, Zychma M, Zucowska-Szczechowska E, Trautsolt W, Szydlowska I. Role of GLUT1 gene in susceptibility to diabetes nephropathy in type 2 diabetes. *Kidney Int*. 2001;59(2):631-636.

Gutierrez C, Vendrell J, Pastor R, Broch M, Aguilar C, Llor C, et al. GLUT1 gene polymorphism in non-insulin-dependent diabetes mellitus: genetic susceptibility relationship with cardiovascular risk and microangiopathic complications in a Mediterranean population. *Diabetes Res Clin Pract*. 1998;41(2):113-120.

Heilig CW, Brosius FC, Cunningham C. Role for GLUT1 in diabetic glomerulosclerosis. *Expert Rev Mol Med*. 2006;8(4):1-18.

Henry DN, Busik JV, Brosius FC 3rd, Heilig CW. Glucose transporters control gene expression of aldose reductase, PKC alpha, and GLUT1 in mesangial cells in vitro. *Am J Physiol*. 1999;277(1-2):97-104.

Hill C, Flyvbjerg A, Gronbaek H, Petrik J, Hill DJ, Thomas CR, et al. The renal expression of transforming growth factor-isoforms and their receptors in acute and chronic experimental diabetes in rats. *Endocrinology*. 2000;141(3):1196-1208.

Hills C, Squires PE. The role of TGF- β and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(3):131-9.

Hodgkinson AD, Millward BA, Demaine AG. Polymorphisms of the glucose transporter (GLUT1) gene are associated with diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2001;59(3):985-989.

Hodgkinson AD, Page BA, Millward BA, Demaine AG. A novel polymorphism in the 5'flanking region of the glucose transporter (GLUT1) gene is strongly associated with diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *J diabetes complications*. 2005;19(2):65-69.

Holmkvist J, Cervin C, Lyssenko V, Winckler W, Anevski D, Cilio C, et al. Common variants in HNF-1 alpha and risk of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2006;49(12):2882-91.

Hovind P, Tarnow L, Rossing P, Jensen BR, Graae M, Torp I, et al . Predictors for the development of microalbuminuria and macroalbuminuria in patients with type 1 diabetes: inception cohort study. *BMJ*. 2004;328(7448):1105.

Hsu CC, Kao WL, Steffes MW, Gambir T, Brancati FL, Heilig CW. Genetic variation of Glucose Transporter-1 (GLUT1) and albuminuria in 10,278 European Americans and African Americans: a case-control study in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *BMC Medical Genetics*. 2011;45(19):12-16.

Inoki K, Haneda M, Maeda S, Koya D, Kikkawa R. TGF-beta 1 stimulates glucose uptake by enhancing GLUT1 expression in mesangial cells. *Kidney Int* 1999;55(5):1704–1712.

Isomaa B, Henricsson M, Letho M, Forsblom C, Karanko S, Sarelin L, et al. Chronic diabetic complications in patients with MODY3 diabetes. *Diabetologia* 1998;41(4): 467-73.

Iwano M, Kubo A, Nishino T, Sato H, Nishioka H, Akai Y, et al. Quantification of glomerular TGF β 1 mRNA in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int*. 1996;49(4):1120-1126.

Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, 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.

Li Y, Liu D, Liu Z, Zhang J, Chen Z, Li L. Identification and function of glucose transporter 1 in human mesangial cells. *Chin Med j.* 2001;114(8):824-8.

Li Z, Zhang Z, He Z, et al. A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>). *Cell research.* 2009;19:519-23).

Liu ZH, Guan TJ, Chen ZH, Li LS. Glucose transporter (GLUT1) Allele (Xba 1-) associated with nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1999;55(5):1843-1848.

Liu E, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes mellitus associated autoimmunity. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002;31(2):391-410.

Klemm T, Paschke R.. Possible genetic causes for late complications of diabetes mellitus. *Med Klin (Munich).* 2000;95(1):31-9.

Makni K, Jarraya F, Rebai M, Mnif F, Boudawara M, Hamza N, et al. Risk genotypes and haplotypes of the GLUT1 gene for type 2 diabetic nephropathy in the Tunisian population. *Ann Hum Biol.* 2008;35(5):490-498.

Massague J. TGF β signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-791.

Milech A, Oliveira JEP. Diabetes mellitus: clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar. São Paulo: Atheneu; 2004.

Moller AM, Jensen NM, Pildal J, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, UrhammerSA, et al. Studies of genetic variability of the glucose transporter 2 promoter in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(5):2181–2186.

Murakami T, Nishiyama T, Shirotani T, Shinohara Y, Kan M, Ishii K, Kanai F, Nakazuru S, Ebina Y. Identification of two enhancer elements in the gene encoding the type 1 glucose transporter from the mouse which are responsive to serum, growth factor, and oncogenes. *J Biol Chem.* 1992 May 5;267(13):9300-6

Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, Osada S, Nagaoka I, Tomino Y, Koide H. mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. *Diabetes.* 1993;42(3):450-456.

Ng DP, Canani L, Araki S, Smiles A, Moczulski D, Warram JH, Krolewski AS.

Minor effect of GLUT1 polymorphism on susceptibility to diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(7):2264-2269.

Ng DP, Warram J, and Krolewski A. TGF-beta 1 as a genetic susceptibility locus for advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus: an investigation of multiple known DNA sequence variants. *Am J Kidney Dis*. 2003;41(1):22-8.

Nishikawa T, Edelstein D and Brownlee M. The missing link: A single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney International*. 2000;58:S26–S30.

Nose A, Mori Y, Uchiyama-Tanaka Y, Kishimoto N, Maruyama K, Matsubara H, Iwasaka T. Regulation of glucose transporter (GLUT1) gene expression by angiotensin II in mesangial cells: involvement of HB-EGF and EGF receptor transactivation. *Hypertens Res*. 2003;26(1):67-73.

Ott MO, Rey-Campos J, Cereghini S and Yaniv M. vHnf1 is expressed in epithelial cells of distinct embryonic origin during development and precedes Hnf1 expression. *Mech. Dev*. 1991;36(1-2):47-58.

Pontoglio M, Sreenan S, Roe M, Pugh W, Ostrega D, Doyen A, et al. Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1a-deficient mice. *J Clin Invest*. 1998;101(10):2215-22.

Quinn M, Angelico MC, Warram JH, Krolewski AS. Familial factors determine the development of nephropathy in patients with IDM. *Diabetologia*. 1996;39(8):940-5.

Roglic G, Colhoun HM, Stevens LK, Lemkes HH, Manes C, Fuller JH. Parental history of hypertension and parental history of diabetes and microvascular complications in insulin dependent diabetes mellitus: the eurodiab IDDM complications study. *Diabet Med*. 1998;15(5):418-26.

Rossing P. The changing epidemiology of diabetic microangiopathy in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2005;48(8):1439-44.

Seaquist ER, Goetz FC, Rish 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.

Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Watanabe Y, Santos DR. Chronic dialysis in Brazil - report of the brazilian dialysis census, 2011. *J Bras Nefrol*. 2012;34(3):272-277.

Schaan BD, Irigoyen MC, Lacchini S, Moreira ED, Schmid H, Machado UF. Sympathetic modulation of the renal glucose transporter GLUT2 in diabetic rats. *Auton Neurosci*. 2005;117(1):54-61.

Schaan BD, Lacchini S, Bertoluci MC, Irigoyen MC, Machado UF, Schmid H. Increased renal GLUT1 abundance and urinary TGF-beta 1 in streptozotocin-induced diabetic rats: implications for the development of nephropathy complicating diabetes. *Horm Metab Res*. 2001;33(11):664-9.

Scheepers A, Joost HG, Schurmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: Molecular basis of normal and aberrant function. *J Parenter Enteral Nutr*. 2004;28(5):364-71.

Shi Y and Massague J. Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell*. 2003;113(6):685–700.

Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet*. 2006;38(2):209-213.

Tarnow L, Grarup N, Hansen T, Parving HH, Petersen O. Diabetic microvascular complications are not associated with two polymorphisms in the GLUT1 and PC-1 genes regulating glucose metabolism in Caucasian type 1 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(8):1653-1656.

The Diabetes Control and Complication Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complication in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J med. 1993;329:977-86.

Transcriptional Start Sites – Site - http://dbtss_old.hgc.jp/hg17

Valladares-Salgado A, Javier A, Angeles-Martinez, Rosas M, Garcia-Mena J, Utrera-Barillas D, et al. Association of polymorphisms within the transforming growth factor- β 1 gene with diabetic nephropathy and serum cholesterol and triglyceride concentrations. Nephrology. 2010;15(6):644-648.

VanLiere JM, Rosenberg NA. Mathematical properties of the r^2 measure of linkage disequilibrium. Theor Popul Biol. 2008 Aug;74(1):130-7

Vestri S, Okamoto MM, de Freitas HS, Aparecida dos Santos R, Nunes MT, Morimatsu M, et al. Changes in sodium or glucose filtration rate modulate expression of glucose transporters in renal proximal tubular cells of rat. J Membr Biol. 2001;182(2):105-182.

Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). Nature. 1996;384(6608):455-458.

Weigert C, Brodbeck K, Brosius FC, Huber M, Lehmann R, Friess U, et al. Evidence for a novel TGF-beta1-independent mechanism of fibronectin production in mesangial cells overexpressing glucose transporters. *Diabetes*. 2003;52(2):527-535.

Wright EM. "Renal Na(+)-glucose cotransporters." *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;280(1):8-10.

Zeggini E, Rayner W, Morris AP, et al. An evaluation of HapMap sample size and tagging SNP performance in large-scale empirical and simulated data sets. *Nat Genet* . 2005;37:1320–2

Zelmanovitz T, Gerchman F, Balthazar AP, Thomazelli FC, Matos JD, Canani LH. Diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr*. 2009;1(1):10.

Zhang J, Liu Z, Liu D, Li L. Identification of glucose transporter- 1 and its functionation assay in mouse glomerular mesangial cells cultured in vitro. *Chin Med Sci J*. 2001;16(1):35-9.

Ziyadeh FN, Sharma K. Role of transforming growth factor- β in diabetic glomerulosclerosis and renal hypertrophy. *Kidney Int*. 1995;51:S34-36.

APÊNDICE

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 que Codificam Transportadores de Glicose 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

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

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 10/12/2009 a 10/12/2012

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

O diabetes melito tipo 1 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 do grupo controle (Indivíduos sem a doença) dessa pesquisa que tem por objetivo identificar genes que possam estar relacionados na causa do desenvolvimento das doenças associadas ao diabetes. O grupo controle é utilizado para fazer uma comparação entre os indivíduos sem a doença e indivíduos com a Diabetes melitus tipo 1.

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. 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.

9 – 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. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros indivíduos, 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 que Codificam Transportadores de Glicose 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. 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.

Responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

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 28/04/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0122/10**, intitulado: **"ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS EM GENES QUE CODIFICAM TRANSPORTADORES DE GLICOSE 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").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Maria Lúcia Corrêa-Giannella**

Pesquisador (a) Executante: **Tatiana Marques Ferreira da Rocha**

CAPPesq, 30 de Abril 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 3089 6442 Fax: 011 3089 6492 e-mail: cappesq@hconet.usp.br / secretariacappesq2@hconet.usp.br