

**THIAGO ANDRADE PATENTE**

**Associação de polimorfismos de um único nucleotídeo nos genes *GPX4*, *CYBB*, *CYBA*, *CAT* e *SLC2A2* e a susceptibilidade à doença renal crônica em coortes brasileira e francesas de 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 Cardillo Corrêa Giannella

**São Paulo  
2014**

**THIAGO ANDRADE PATENTE**

**Associação de polimorfismos de um único nucleotídeo nos genes *GPX4*, *CYBB*, *CYBA*, *CAT* e *SLC2A2* e a susceptibilidade à doença renal crônica em coortes brasileira e francesas de 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 Cardillo Corrêa Giannella

**São Paulo  
2014**

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Patente, Thiago Andrade

Associação de polimorfismos de um único nucleotídeo nos genes *GPX4*, *CYBB*, *CYBA*, *CAT* e *SLC2A2* e a susceptibilidade à doença renal crônica em coortes brasileira e francesas de portadores de diabetes mellitus tipo 1 / Thiago Andrade Patente. -- São Paulo, 2014.

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

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella.

Descritores: 1.Polimorfismo de nucleotídeo único 2.Nefropatias diabéticas  
3.Estresse oxidativo 4.NADPH oxidase 5.Catalase 6.Glutationa peroxidase  
7.Transportador de glicose tipo 2

USP/FM/DBD-208/14

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais,  
que sempre estiveram ao meu lado em todos  
os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Clayton e Sônia, por todo o apoio prestado durante estes anos e por sempre me apoiarem, não importando qual seria a minha decisão. Por todo o amor, carinho e compreensão que sempre me forneceram. Nunca mediram esforços para que eu pudesse concretizar mais esta etapa.

Ao meu irmão, Lucas, pelo companheirismo, ajuda e momentos vividos até hoje.

A Tamires por toda ajuda e compreensão nos momentos difíceis; pelo companheirismo de todos os dias e por sempre estar disposta a me auxiliar quando precisei de qualquer coisa.

A Dra. Maria Lúcia Corrêa Giannella, minha orientadora, por me acolher como aluno, ainda durante a iniciação científica, e ter me auxiliado em mais uma etapa da minha carreira profissional. Muito obrigado pela dedicação ao meu trabalho e por todas as vezes em que me acolheu fosse para resolver problemas ou para conselhos.

Ao Dr. Cássio Coimbra por ter me colocado dentro da Faculdade de Medicina da USP, por ter enxergado em mim alguém em quem ele pudesse confiar para levar ao laboratório onde ele frequentou.

Aos meus amigos da época de colégio e da época da faculdade, por compreenderem as dificuldades e ajudarem no que fosse possível.

À todos os funcionários do LIM-25, em especial ao Dr. Ricardo Giorgi e a Ângela Fortes por todos os momentos de aprendizado e descontração no laboratório.

A todos os alunos e ex-alunos do LIM-25, em especial à Maria Beatriz, Daniele Santos, Ester Brust, Viviane Blois, Érica, Ana Lúcia, Ricardo Perez e Sharon Nina, pelas tardes de discussão, almoços e descontração.

A FAPESP pelo apoio financeiro, por meio da bolsa de mestrado nº 2011/15015-8 e da bolsa BEPE nº 2013/04002-8

Esta dissertação ou tese 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.

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

## SUMÁRIO

Lista de Figuras  
Lista de Tabelas  
Lista de Siglas e Símbolos  
Resumo  
Abstract

1.	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Diabetes.....	21
1.2	Nefropatia diabética.....	23
1.3	Hiperglicemia, estresse oxidativo e complicações microvasculares .....	26
1.4	Sistemas antioxidantes e pro-oxidantes.....	32
1.4.1	O sistema glutatona.....	33
1.4.2	O sistema catalase.....	34
1.4.3	O sistema NADPH oxidase.....	35
1.5	Transportadores de glicose.....	37
2.	OBJETIVOS.....	41
3.	METODOLOGIA.....	42
3.1	Pacientes.....	42
3.1.1	Coorte SURGENE ( <i>Survival Genetic Nephropathy</i> ).....	42
3.1.2	Coorte GENEDIAB.....	42
3.1.3	Coorte GENESIS.....	43
3.1.4	Coorte brasileira.....	43
3.2	Classificação da nefropatia diabética.....	44
3.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.....	44
3.4	Escolha do polimorfismos.....	45
3.4.1	<i>GPX4</i> e <i>CYBB</i> .....	45
3.4.2	<i>CAT</i> .....	46
3.4.3	<i>CYBA</i> .....	46
3.4.4	<i>SLC2A2</i> .....	47
3.5	Análise estatística.....	47
4.	RESULTADOS.....	50
4.1	Características Clínicas.....	50
4.1.1	Coorte SURGENE.....	50
4.1.2	Coorte GENESIS/GENEDIAB.....	51
4.1.3	Coorte brasileira.....	52
4.2	<i>GPX4</i> .....	59
4.2.1	Coorte GENESIS/GENEDIAB.....	59
4.2.2	Coorte brasileira.....	59
4.3	<i>CYBB</i> .....	62
4.3.1	Coorte GENESIS/GENEDIAB.....	62



4.3.2	Coorte brasileira.....	63
4.4	<i>CAT</i> .....	65
4.4.1	Coorte SURGENE.....	65
4.4.2	Coorte GENEDIAB.....	66
4.4.3	Coorte brasileira.....	67
4.5	<i>CYBA</i> .....	68
4.5.1	Coorte SURGENE.....	68
4.5.2	Coorte GENESIS/GENEDIAB.....	71
4.5.3	Coorte brasileira.....	74
4.6	<i>SLC2A2</i> .....	74
4.6.1	Coorte SURGENE.....	74
4.6.2	Coorte GENESIS/GENEDIAB.....	76
5.	DISCUSSÃO.....	79
6.	CONCLUSÕES.....	93
7.	ANEXOS.....	94
8.	REFERÊNCIA.....	138

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aldose redutase e a via dos polióis. <i>Nature</i> 414:813-820, 2001. NAD: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina; NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina hidreto; NADPH: nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio; NADP <sup>+</sup> : nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato; GSH: glutationa; GSSG: glutationa oxidada.....	27
Figura 2	Mecanismos pelo qual a produção intracelular de produtos finais de glicação avançada danifica células vasculares. <i>Nature</i> 414:813-820, 2001. AGE: produto final de glicação avançado; ROS: espécies reativas de oxigênio; DNA: ácido desoxirribonucleico; RNA: ácido ribonucleico.....	28
Figura 3	Consequências da ativação da proteína cinase C (PKC) pelo processo de hiperglicemia. <i>Nature</i> 414:813-820, 2001. DAG: diacilglicerol; PKC: proteína cinase C; eNOS: óxido nítrico sintetase endotelial; ET-1: endotelina 1; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial; TGF- $\beta$ : fator de crescimento tumoral-beta; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio 1; NF-kB: fator nuclear kB; ROS: espécies reativas de oxigênio; NADP(H): nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio.....	29
Figura 4	Via das hexosaminas e o efeito da N-acetilglicosaminação na ativação de fatores de transcrição. <i>Nature</i> 414:813-820, 2001. Gluc-6-P: glicose-6-fosfato; Fruc-6-P: frutose-6-fosfato; GFAT: glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase; AZA: azaserina; AS-GFAT: antisenso da GFAT; GlcNAc: N-acetilglicosamina; TGF- $\beta$ : fator de crescimento tumoral-beta; Glu: glicose; Gln: glicosamina; OGT: <i>O-linked</i> N-acetilglicosamina.....	30
Figura 5	Mecanismo unificador, no qual a produção excessiva de radical superóxido, em decorrência da hiperglicemia, desencadearia um aumento nas quatro principais vias implicadas na patogênese das complicações microvasculares do diabetes.....	32
Figura 6	Sistema NADPH Oxidase e as subunidades que o compõem. Diversas proteínas NOX podem compor este sistema, embora a proteína NOX2 seja o protótipo das proteínas NOXs e do sistema NADPH Oxidase.....	36
Figura 7	Reabsorção renal da glicose mediado pelos transportadores de glicose SGLT e GLUT no túbulo contorcido proximal.....	38
Figura 8	(a) Taxa de Filtração Glomerular estimada (TFGe) nas coortes	

	GENESIS/GENEDIAB determinada por análise de ANCOVA com base em um modelo recessivo para o alelo raro T do rs713041 no gene <i>GPX4</i> . (b) Probabilidade estimada de evolução dos estágios de nefropatia diabética na coorte brasileira determinada por análise de regressão logística nominal com base no <i>Odds Ratio</i> (OR) obtido em um modelo dominante para o alelo raro T do rs713041 no gene <i>GPX4</i> .....	60
Figura 9	(a) Probabilidade estimada de evolução dos estágios de nefropatia diabética nas coortes GENESIS/GENEDIAB, determinada por regressão logística nominal com base no <i>Odds Ratio</i> (OR) obtido em um modelo dominante para o alelo raro A do rs6610650 no gene <i>CYBB</i> . (b) Taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) na coorte brasileira determinada por análise de ANCOVA com base em um modelo recessivo para o alelo raro A do rs6610650 no gene <i>CYBB</i> .....	63
Figura 10	Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Coorte SURGENE: Incidência de eventos renais em função do polimorfismo rs7947841 no gene <i>CAT</i> : GG (n=276), GA (n=61), AA (n=3)...	66
Figura 11	Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Coorte GENEDIAB: Incidência de insuficiência renal crônica terminal em função do polimorfismo rs7947841 no gene <i>CAT</i> : GG (n=249), GA (n=63), AA (n=3).....	67
Figura 12	Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos no gene <i>CYBA</i> na coorte SURGENE determinado por (a) D' e (b) r <sup>2</sup> .....	70
Figura 13	Coorte SURGENE: HR ( <i>hazards ratio</i> ) e intervalo de confiança (IC) 95% para o alelo raro do rs9932581 no gene <i>CYBA</i> determinado em um modelo codominante de regressão de risco proporcional de Cox, ajustado por sexo, idade, tempo de DM, índice de massa corpórea, pressão arterial sistólica (PAS), média da PAS ao longo do tempo de estudo, uso de inibidor da enzima conversora da angiotensina na fase basal e ao final do estudo, tratamento para a hipertensão arterial e progressão da retinopatia diabética.....	70
Figura 14	Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier, coorte SURGENE: incidência de eventos renais em função do polimorfismo rs9932581 no gene <i>CYBA</i> : CC (n=119), CT (n=151), TT (n=51).....	71
Figura 15	Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos no gene <i>CYBA</i> nas coortes GENESIS/GENEDIAB determinado por (a) D' e (b) r <sup>2</sup> .....	72

Figura 16	Coorte GENESIS/GENEDIAB: HR ( <i>hazards ratio</i> ) e intervalo de confiança (IC) 95% para o alelo raro do rs9932581 no gene <i>CYBA</i> determinado em um modelo codominante de regressão de risco proporcional de Cox, ajustado por coorte, sexo, idade, tempo de DM, índice de massa corpórea, uso de inibidor da enzima conversora da angiotensina e bloqueador do receptor de angiotensina, HbA1c e retinopatia diabética.....	73
Figura 17	Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Coorte GENESIS/GENEDIAB: Incidência de insuficiência renal crônica terminal em função do polimorfismo rs9932581 no gene <i>CYBA</i> : CC (n=256), CT (n=277), TT (n=125).....	73
Figura 18	Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos no gene <i>SLC2A2</i> na coorte SURGENE determinado por D' (a) e r <sup>2</sup> (b)...	75
Figura 19	Variação da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) durante o tempo de seguimento em (a) %/ano e (b) ml/min/ano <sup>-1</sup> na coorte SURGENE de acordo com os genótipos do polimorfismo rs11924032 no gene <i>SLC2A2</i> : GG (n=136), XA (n=147). Resultados expressos em média ± EPM.....	76
Figura 20	Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos no gene <i>SLC2A2</i> nas coortes GENESIS/GENEDIAB determinado por D' (a) e r <sup>2</sup> (b).....	77
Figura 21	Coorte GENESIS/GENEDIAB: HR ( <i>hazards ratio</i> ) e IC 95% para o alelo raro do rs11924032 no gene <i>SLC2A2</i> determinado em um modelo codominante de regressão de risco proporcional de Cox, ajustado por coorte, sexo, idade, tempo de DM, pressão arterial sistólica (PAS), HbA1c e retinopatia diabética..	77
Figura 22	Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Coorte GENESIS/GENEDIAB: Incidência de insuficiência renal crônica em função do polimorfismo rs11904032 no gene <i>SLC2A2</i> : GG (n=354), GA (n=240), AA (n=42).....	78
Figura 23	Modelo de predição discriminando os possíveis fatores de transcrição que interagem na presença do alelo (a) T ou (b) C...	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínicas das quatro coortes estudadas.....	54
Tabela 2	Características clínicas dos pacientes da coorte SURGENE de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal.....	55
Tabela 3	Características clínicas dos pacientes na fase basal pela incidência de eventos renais (coorte SURGENE) ou insuficiência renal crônica terminal (GENESIS/GENEDIAB) durante o acompanhamento do estudo.....	56
Tabela 4	Características clínicas dos pacientes da coorte GENESIS de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal.....	57
Tabela 5	Características clínicas dos pacientes da coorte GENEDIAB de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal.....	58
Tabela 6	Características clínicas dos pacientes da coorte brasileira de acordo com os estágios de nefropatia diabética.....	59
Tabela 7	Coorte brasileira: frequência genotípica do rs713041 no gene <i>GPX4</i> de acordo com os estágios de nefropatia diabética.....	62
Tabela 8	Coortes francesas GENESIS/GENEDIAB: frequência genotípica do rs6610650 no gene <i>CYBB</i> e do rs713041 no gene <i>GPX4</i> de acordo com os estágios de nefropatia diabética.....	65
Tabela 9	Resultados observados para o polimorfismos rs7947841 no gene <i>CAT</i> nas três coortes estudadas com relação a prevalência de nefropatia diabética (ND) incipiente ou estabilizada/avançada (expressos em <i>odds ratio</i> [OR] e intervalo de confiança [IC] de 95%) e a incidência de eventos renais ou insuficiência renal crônica terminal (IRCT) (expresso em <i>hazard ratio</i> [HR] e IC de 95%).....	69
Tabela 10	Resultados observados para o polimorfismos rs9932581 no gene <i>CYBA</i> nas três coortes estudadas com relação a prevalência de nefropatia diabética (ND) incipiente ou estabilizada/avançada (expressos em <i>odds ratio</i> [OR] e intervalo de confiança [IC] de 95%) e a incidência de eventos renais ou insuficiência renal crônica terminal (IRCT) (expresso em <i>hazard ratio</i> [HR] e IC de 95%).....	75

## LISTADE SIGLAS E SÍMBOLOS

ACR	Razão albumina/creatinina urinária
AGE	Produto final de glicação avançada
ANCOVA	Análise de covariância
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
DAG	Diacilglicerol
DL	Desequilíbrio de ligação
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
DRC	Doença renal crônica
dsRNA	Ácido ribonucléico dupla fita
EUA	Excreção urinária de albumina
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GAD	Descarboxilase do ácido glutâmico
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GDP	Guanosina difosfato
GENEDIAB	<i>Génétique de la Néphropathie Diabétique</i>
GLUT	Transportador de glicose
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida

GTP	Guanosina trifosfato
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA1C	Hemoglobina glicada
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HR	<i>Hazard ratio</i>
IA-2	Antígeno celular da ilhota - 2
IAA	Anticorpo anti-insulina
IC	Intervalo de confiança
ICA	Anticorpo contra a ilhota
IECA	Inibidor da enzima conversora da angiotensina
IL	Interleucina
IRCT	Insuficiência renal crônica terminal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDRD	Modificação da Dieta em Doença Renal
MnSOD	Manganês Superóxido desmutase
mQ	millique
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio
ND	Nefropatia diabética
NO	Oxido nítrico
OR	<i>Odds Ratio</i>
PAI-1	Inibidor do plasminogênio ativado 1
PAS	Pressão arterial sistólica

PAD	Pressão arterial diastólica
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PKC	Proteína cinase C
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RAGE	Receptor dos produtos finais de glicação avançada
SGLT	Transportador de glicose acoplado ao sódio
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
SURGENE	<i>Survival Genetic Nephropathy</i>
TFG	Taxa de filtração glomerular
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimada
TG	Triglicérides
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UDPGlcNAc	Uridina difosfato-N-acetil glicosamina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular



Patente, TA. *Associação de polimorfismos de um único nucleotídeo nos genes GPX4, CYBB, CYBA, CAT e SLC2A2 e a susceptibilidade à doença renal crônica em coortes brasileira e francesas de portadores de diabetes mellitus tipo 1*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A nefropatia diabética (ND) é uma das principais causas de nefropatia crônica, o que torna o diabetes mellitus (DM) responsável por 44% da prevalência de doença renal crônica (DRC) no mundo. O papel do estresse oxidativo na patogênese da ND está bem estabelecido e genes pertencentes a vias pró- e antioxidantes são possíveis candidatos a conferirem susceptibilidade genética a essa e a outras complicações crônicas. Além do estresse oxidativo, o transporte intracelular de glicose, mediado por transportadores específicos, também parece exercer influência sobre a ND e outras complicações. O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre ND e alguns polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) em genes que codificam proteínas transportadoras de glicose (GLUT2 [SLC2A2]), proteínas pró-oxidantes (p22<sup>phox</sup> [CYBA] e NOX-2 [CYBB]) e proteínas antioxidantes (glutathiona peroxidase-4 [GPX4] e catalase [CAT]) em uma coorte brasileira (n=453; 45,8% de pacientes com ND) e três coortes francesas (SURGENE [n=340; 17,7% de pacientes com ND na fase basal], GENEDIAB [n=313; 66,7% de pacientes com ND] e GENESIS [n=636; 49,7% de pacientes com ND]) de pacientes portadores de DM tipo 1. Os SNPs foram genotipados com o uso da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e os resultados expressos em *odds ratio* (OR) ou *hazard ratio* (HR), com seus respectivos intervalos de confiança (IC), determinados em modelos ajustados de regressão logística politômica ou regressão de risco proporcional de Cox, respectivamente. A razão albumina/creatinina urinária (ACR) ou a taxa de excreção urinária de albumina (EUA) foram utilizadas para definir os estágios de ND e os pacientes foram classificados de acordo com a presença ou ausência de ND incipiente (ACR 30 – 300 mg/g de creatinina ou EUA 20 – 200 µg/min ou 20 – 200 mg/L) e creatinina plasmática <1,7 mg/dL), ND estabilizada (ACR >300 mg/g de creatinina ou EUA >200 µg/min ou > 200 mg/L e creatinina plasmática <1,7 mg/dL) ou ND avançada (ACR >300 mg/g de creatinina ou EUA >200 µg/min ou >200 mg/L e creatinina plasmática >1,7 mg/dL ou qualquer terapia de reposição renal) e também foram avaliadas associações dos SNPs com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). O alelo raro A do SNP rs6610650 no gene *CYBB* foi associado com valores baixos de TFGe em mulheres na coorte brasileira e com a prevalência de ND estabilizada/avançada em mulheres da coorte francesa (OR 1,75; IC 95% 1,11 – 2,78;  $p=0,016$ ). O alelo raro T do SNP rs713041 no gene *GPX4* foi inversamente associado com a prevalência de ND estabilizada/avançada em homens na coorte brasileira (OR 0,30, IC95% 0,13 – 0,68,  $p=0,004$ ) e com valores elevados de TFGe em homens na coorte francesa. O alelo raro A do SNP rs7947841 no gene *CAT* foi associado com a prevalência de ND incipiente (OR 2,79; IC95% 1,21 – 6,24;  $p=0,01$ ) e ND estabilizada/avançada (OR 5,72; IC95% 1,62 – 22,03;  $p=0,007$ ), bem como com a incidência de eventos renais, definidos como novos casos de microalbuminúria ou progressão para um estágio mais grave de ND durante o seguimento de estudo, na coorte SURGENE (HR 1,82; IC95% 1,13 – 2,81;  $p=0,01$ ). O mesmo alelo de risco associou-se com a prevalência de ND incipiente (OR 3,13; IC95% 1,42 – 7,24;  $p=0,004$ ) e com a incidência de insuficiência renal crônica terminal (IRCT) na coorte GENEDIAB (HR 2,11; IC95% 1,23 – 3,60;  $p=0,008$ ) e com a prevalência de ND incipiente (OR 2,16; IC95% 1,14 – 4,10,  $p=0,02$ ) e ND estabilizada/avançada (OR 2,71; IC95% 1,38 – 5,42;  $p=0,004$ ) na coorte brasileira. O alelo raro T do SNP rs9932581 no

gene *CYBA* foi inversamente associado com a prevalência de ND estabilizada/avançada (OR 0,60; IC95% 0,46 – 0,78;  $p=0,0001$ ) e com valores mais baixos de TFGe nos pacientes de descendência europeia da coorte GENESIS/GENEDIAB. Este mesmo alelo foi associado com a incidência de eventos renais e de IRCT nas coortes SURGENE (HR 0,63; IC95% 0,46 – 0,86;  $p=0,003$ ) e GENESIS/GENEDIAB (HR 0,51; IC95% 0,31 – 0,78;  $p=0,002$ ), respectivamente. Entretanto estes resultados não foram replicados na coorte brasileira. O alelo raro T do SNP rs11924032 no gene *SLC2A2* foi inversamente associado com a perda da TFGe ao longo do tempo (0,02%/ano vs 2,18%/ano para os pacientes portadores do genótipo GG;  $p=0,005$ ), na coorte SURGENE. Este mesmo alelo foi inversamente associado com a incidência de IRCT nas coortes GENESIS/GENEDIAB (HR 0,53; IC95% 0,29 – 0,89;  $p=0,01$ ). Os resultados observados para o gene *SLC2A2* não forneceram fortes indícios para afirmarmos que este gene exerça um papel relevante no desenvolvimento da ND nos pacientes com DM tipo 1 nas coortes francesas estudadas. Em contrapartida, os SNPs nos genes que codificam as proteínas pró-oxidantes *CYBA* e *CYBB* e as proteínas antioxidantes *GPX-4* e *CAT* foram capazes de modular o risco para doença renal em pacientes portadores de DM tipo 1, sendo que os SNPs presentes nos genes *CYBB*, *GPX4* e *CAT* tiveram seus resultados replicados em coortes independentes, o que corrobora a importância destes genes e, conseqüentemente, do estresse oxidativo, na patogênese da ND.

**Descritores:** Polimorfismo de nucleotídeo único, Nefropatias diabéticas, Estresse oxidativo, NADPH oxidase, Catalase, Glutathiona peroxidase, Transportador de glucose tipo 2

Patente, TA. *Association of single nucleotide polymorphisms in the genes GPX4, CYBB, CYBA, CAT e SLC2A2 and the susceptibility to chronic kidney disease in Brazilian and French cohorts of type 1 diabetes mellitus patients*. [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Diabetic nephropathy (DN) is a major cause of chronic nephropathy, with diabetes mellitus (DM) accounting for 44% of the prevalence of chronic kidney disease (CKD) in the world. The role of oxidative stress in the pathogenesis of DN is well established and genes belonging to pro- and antioxidant pathways are possible candidates to confer genetic susceptibility to this and other chronic complications. Besides oxidative stress, intracellular glucose transport mediated by specific transporters, also appears to influence DN and other complications. The aim of this study was to evaluate the association between DN and some single nucleotide polymorphisms (SNPs) present in genes encoding glucose transport proteins (GLUT2 [*SLC2A2*]), pro- (p22<sup>phox</sup> [*CYBA*] and NOX-2 [*CYBB*]) and antioxidants (glutathione peroxidase-4 [*GPX4*] and catalase [*CAT*]) proteins, in a Brazilian cohort [n= 453; 45.8% of patients with DN], and three French cohorts (SURGENE [n=340; 17.7% of patients with DN at baseline], GENEDIAB [n=313; 66.7% of patients with DN], and GENESIS [n=636; 49.7% of patients with DN]) of patients with type 1 DM. The SNPs were genotyped using the technique of real time polymerase chain reaction (PCR) and results expressed as odds ratio (OR) and hazard ratio (HR), with their respectively 95% confidence intervals (CI), determined by adjusted models of polytomic logistic regression and Cox proportional hazard regression, respectively. The albumin/creatinine ratio (ACR) or the urinary albumin excretion (UAE) rate were used to define the DN stages and the patients were classified according to the presence or absence of incipient DN (ACR 30 – 300 mg/g of creatinine or UAE 20 – 200 µg/min or 20 – 200 mg/L) and plasmatic creatinine <1,7 mg/dL), established DN (ACR >300 mg/g of creatinine or EUA >200 µg/min or > 200 mg/L and plasmatic creatinine <1,7 mg/dL) or advanced DN (ACR >300 mg/g of creatinine or UAE >200 µg/min or > 200 mg/L and plasmatic creatinine >1,7 mg/dL or any renal replacement therapy). Associations for the estimated glomerular filtration rate (eGFR) were also evaluated. The rare allele A of the SNP rs6610650 in *CYBB* gene was associated with low values of eGFR in women in the Brazilian cohort and with the prevalence of established/advanced DN in women in the French cohort (OR 1.75, 95%CI 1.11 - 2.78, *p*=0.016). The rare allele T of the SNP rs713041 in *GPX4* gene was inversely associated with the prevalence of established/advanced DN in men in the Brazilian cohort (OR 0.30, 95%CI 0.13 - 0.68, *p*=0.004) and with higher values of eGFR in men in the French cohort. The rare allele A of the SNP rs7947841 in *CAT* gene was associated with the prevalence of incipient DN (OR 2.79, 95%CI 1.21 - 6.24, *p*=0.01) and established/advanced DN (OR 5.72; 95%CI 1.62 - 22.03, *p*=0.007) as well as the incidence of renal events, defined as new cases of microalbuminuria or progression to a more severe stage during the follow-up study, in SURGENE cohort (HR 1.82, 95%CI 1.13 - 2.81, *p*=0.01). The same risk allele was associated with the prevalence of incipient DN (OR 3.13, 95%CI 1.42 - 7.24, *p*=0.004), the incidence of end-stage renal disease (ESRD) in the cohort GENEDIAB (HR 2.11, 95%CI 1.23 - 3.60, *p*=0.008) and with the prevalence of incipient DN (OR 2.16, 95%CI 1.14 - 4.10, *p*=0.02) and established/advanced DN (OR 2.71, 95%CI 1.38 - 5.42, *p*=0.004) in the Brazilian cohort. The rare T allele of the SNP rs9932581 in *CYBA* gene was inversely associated with the prevalence of established/advanced DN (OR: 0.60, 95%CI: 0.46 - .78, *p*=0.0001) and associated with lower values of eGFR in patients of

GENESIS/GENEDIAB cohort. The same allele was inversely associated with the incidence of renal events and ESRD in SURGENE (HR 0.63, 95%CI 0.46 - 0.86,  $p=0.003$ ) and GENESIS/GENEDIAB (HR 0.51, 95%CI 0.31 - 0.78,  $p=0.002$ ) cohorts. However, these results were not replicated in the Brazilian cohort. The rare T allele of the SNP rs11924032 in *SLC2A2* gene was inversely associated with the loss of eGFR during the follow-up (0.02%/year vs. 2.18%/year for patients with the GG genotype,  $p=0.005$ ) in the SURGENE cohort. The same allele was inversely associated with the incidence of ESRD in the GENESIS/GENEDIAB cohorts (HR 0.53, 95%CI 0.29 - 0.89,  $p=0.01$ ). The results observed for the *SLC2A2* gene, in this study, did not provide strong evidence to state that this gene exerts a relevant role in the development of DN in patients with type 1 DM in the studied cohorts. However, SNPs in genes encoding the pro-oxidant proteins CYBA and CYBB, and the antioxidant proteins GPX-4 and CAT were able to modulate the risk of renal disease in patients with type 1 DM. The studied SNPs in *CYBB*, *GPX4* and *CAT* genes had their results replicated in independent cohorts, which confirms the importance of these genes and, hence, of the oxidative stress in the pathogenesis of DN.

**Descriptors:** Single nucleotide polymorphisms, Diabetic nephropathy, Oxidative stress, NADPH oxidase, Catalase, Glutathione peroxidase, Glucose transporter type 2.

## 1. Introdução

### 1.1. Diabetes

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina associados ou não à resistência a ação deste hormônio. O DM é uma das doenças endócrinas mais frequentes em todas as populações, e sua prevalência varia de acordo com o grupo étnico e região geográfica (1, 2). De acordo com o Estudo Multicêntrico da Prevalência do DM no Brasil (3), realizado entre junho de 1986 a julho de 1988, a taxa de prevalência de DM na população brasileira na faixa etária entre 30 e 69 anos, ajustada por idade, variou de 5,22% em Brasília a 9,66% em São Paulo, tendo como média nacional 7,66%. A relação entre o sexo masculino e feminino foi de 1:1,44. Um estudo feito entre setembro de 1996 e novembro de 1997 na cidade de Ribeirão Preto, com a mesma faixa etária utilizada no estudo multicêntrico, demonstrou que 12,1% da população residente nesta cidade (aproximadamente 27.739 pessoas) era portadora de DM, sendo que 25% foi diagnosticada no próprio estudo (4).

Em 2003 a prevalência de DM na população residente na região metropolitana de São Paulo foi estimada em 9,1%, sendo que 4,7% dos pacientes já possuíam conhecimento da doença, enquanto 4,4% dos pacientes foram diagnosticados durante o desenvolvimento do estudo (5). De acordo com dados do Ministério da Saúde (DATASUS), durante o ano de 2008, a taxa de mortalidade por DM no Brasil foi de 26,2/100 mil habitantes, representando 50.627 indivíduos falecidos especificamente pela doença.

Em 2004, Wild et al. desenvolveram um estudo no qual a prevalência do DM para o ano de 2000 e 2030 foi estimada. Para isso foram utilizadas apenas populações diagnosticadas em estudos que fizeram uso do critério utilizado pela Organização

Mundial de Saúde (glicemias superiores a 200 mg/dL duas horas após ingestão de 75g de glicose). Neste estudo, estimou-se que cerca de 171 milhões de pessoas seriam portadoras de DM no ano de 2000 e cerca de 366 milhões no ano de 2030 (6).

Os extremos das manifestações clínicas e a patogênese constituem-se nas bases para a classificação em DM tipo 1 (DM1, doença auto-imune que cursa com quadro clínico exuberante resultante do déficit quase absoluto de insulina) e DM tipo 2 (DM2, pacientes oligo ou assintomáticos onde o déficit de insulina coexiste com a resistência insulínica). A elevação da glicemia observada na doença pode estar acompanhada de outras alterações bioquímicas e de manifestações clínicas cuja gravidade depende do grau de déficit insulínico, das condições ambientais e da evolução das complicações crônicas nos vasos sanguíneos (micro e macroangiopatia diabética). O desenvolvimento de aterosclerose acelerada associado ao DM origina as complicações macrovasculares, como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e insuficiência vascular periférica. Já as complicações microvasculares determinam a retinopatia, a nefropatia e a neuropatia. De tal forma que o DM é uma das principais causas de cegueira, insuficiência renal crônica terminal e neuropatias debilitantes, respectivamente.

O controle intensivo do DM diminui a frequência de complicações microvasculares, porém, está associado ao aumento do número de hipoglicemias (7). Além dos controles glicêmico e pressórico adequados, não existem ainda na literatura fortes preditores para o desenvolvimento das complicações do DM e, embora o bom controle glicêmico seja o objetivo para todos os pacientes, a identificação dos indivíduos com maior susceptibilidade para desenvolvimento das complicações poderia direcionar e otimizar o tratamento intensivo nestes pacientes.

## 1.2. Nefropatia diabética

Durante muitos anos, o DM foi considerado uma doença do rim, somente em meados do século XIX, a doença foi definida como um distúrbio metabólico e, mais tarde, como uma doença endócrina. Os estudos avançaram e atualmente sabe-se que o DM não é uma doença do rim e sim uma doença que pode afetar o rim, progredindo com disfunção, dano ou falência renal (8). A doença renal ocasionada pelo DM é chamada de nefropatia diabética (ND) e ocorre como resultado de alterações hemodinâmicas que, somadas aos efeitos da hiperglicemia, provocam lesões na microcirculação renal, que culminam com a esclerose glomerular (9); mais recentemente, a tubulopatia diabética também tem sido reconhecida e valorizada (10).

O diagnóstico da ND é feito basicamente pela quantificação das concentrações urinárias de albumina, devendo ser realizado pela primeira vez após cinco anos de diagnóstico, em pacientes portadores de DM1, e no momento do diagnóstico em pacientes diabéticos tipo 2. No caso de valores negativos para microalbuminúria, o exame deve ser repetido anualmente (11). Os valores de excreção urinária de albumina (EUA) classificam a doença em microalbuminúria ou ND incipiente, macroalbuminúria e proteinúria (12). A incidência de pacientes diabéticos tipo 1 com microalbuminúria foi de 12,6% em um acompanhamento de sete anos (13) e de 33% em um estudo de 18 anos de acompanhamento dos pacientes (14). O quadro de proteinúria afeta de 15 a 40% dos pacientes portadores de DM1, sendo que o pico da incidência ocorre após 15 a 20 anos de diagnóstico (15). Entre os pacientes portadores de DM tipo 2, esta variação é menor, estando na faixa de 5 a 20% (16). Assim, a ND configura-se como uma das principais causas de nefropatia crônica no mundo, transformando o DM em responsável por 44% da prevalência de doença renal crônica e 38% da incidência de insuficiência renal crônica terminal (17).

Estudos realizados nos anos 80 demonstraram que aproximadamente 80% dos pacientes portadores de DM1 com microalbuminúria evoluíam para o quadro clínico de proteinúria em um período máximo de 14 anos (18). Entretanto, em estudo publicado em 2000, Caramori; Fioretto e Mauer obtiveram dados diferentes, observando que apenas 30 a 45% dos pacientes evoluíram para este mesmo quadro clínico em mais de 10 anos (19). Reduções de 50% nas concentrações de albumina urinária foram demonstradas em 56% dos pacientes com DM1 portadores de microalbuminúria (20) sugerindo que um controle mais intensivo da glicemia e dos valores de pressão arterial está sendo adotado pelos pacientes ao longo dos anos (12).

A ND é classicamente dividida em cinco estágios. O primeiro deles é caracterizado por hiperfiltração glomerular, que está presente em um terço dos portadores de DM 1 ao diagnóstico. Ainda permanece incerto se a hiperfiltração é um indicador precoce da susceptibilidade de um paciente à lesão renal induzida por hiperglicemia, uma vez que há estudos que demonstram um papel deletério da hiperfiltração (21), enquanto outros não confirmaram esse achado (22).

O segundo estágio, caracterizado por lesões glomerulares iniciais e EUA normal, consiste no espessamento da membrana basal glomerular e no aumento da matriz mesangial que se iniciam após aproximadamente 18 a 36 meses do início do DM1 e podem se tornar mais proeminentes após 3,5 a 5 anos de doença. O terceiro estágio, denominado de ND incipiente, caracteriza-se pela presença de microalbuminúria persistente (EUA 30 – 299 mg/g de creatinina).

O quarto estágio, denominado ND franca ou clínica caracteriza-se por proteinúria, queda da taxa de filtração glomerular (TFG) e hipertensão arterial sistêmica (HAS) e usualmente ocorre 15 a 20 anos após o início do DM1. O quinto estágio, denominado de doença renal terminal, ocorre após 20 a 30 anos de doença e acomete aproximadamente 30 a 40% dos pacientes com DM1 (23).



A microalbuminúria era tradicionalmente considerada um marcador de risco preditivo primário para os estágios avançados de doença renal crônica (DRC). Estudos mais recentes, no entanto, demonstraram que a microalbuminúria parece ser um processo dinâmico que apresenta maior probabilidade de remitir para normoalbuminúria do que de progredir para proteinúria. A incidência cumulativa de remissão em seis anos é da ordem de 50%, maior que o risco de progressão para proteinúria, que varia de 15 a 25% em alguns estudos epidemiológicos (24).

Os conceitos de que a microalbuminúria sempre precede a queda da TFG e de que todos os pacientes com doença renal terminal desenvolvem previamente proteinúria têm sido questionados e vários estudos têm avaliado melhor a relação temporal entre o início da perda da função renal e a EUA.

No *Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study*, quase 10% dos pacientes com microalbuminúria incidente já apresentavam franca diminuição da função renal no momento do início da microalbuminúria, indicando que o declínio da função renal pode preceder a microalbuminúria (25). Uma coorte de portadores de DM1 normoalbuminúricos do *First Joslin Kidney Study on the Natural History of Microalbuminuria in Type 1 Diabetes* foi seguida até o início da microalbuminúria. Setenta e nove participantes que desenvolveram microalbuminúria nos primeiros quatro anos de seguimento foram acompanhados por 12 anos para caracterizar as alterações longitudinais da EUA e da TFG; 29% desses pacientes apresentaram TFG <60 mL/min e quase metade deles nunca desenvolveu proteinúria. Com base nesses resultados, Perkins e Krolewski propuseram um novo modelo de ND que considera que: (1) o início da microalbuminúria é um processo dinâmico no qual a remissão é mais comum; (2) o declínio precoce da função renal se inicia tão precocemente quanto a microalbuminúria em 30% dos pacientes; (3) o declínio precoce da função renal é um processo linear progressivo que leva à diminuição da função renal em um subgrupo de

pacientes, independentemente da evolução da EUA. Embora não esteja estabelecido se a microalbuminúria causa o declínio precoce da função renal, o início do processo não depende de proteinúria e esses autores levantam a possibilidade de que a EUA e o declínio precoce da função renal representem fenótipos paralelos que têm em comum os mesmos mecanismos etiológicos (24).

### **1.3. Hiperglicemia, estresse oxidativo e complicações microvasculares**

A hiperglicemia é a principal manifestação do DM e pode levar a disfunção endotelial que, mantendo-se persistente por longos períodos, pode originar as complicações diabéticas, tais como a ND (26).

Os mecanismos propostos pelos quais a hiperglicemia induz disfunção endotelial e dano celular são: aumento na ativação da via dos polióis; aumento da formação dos produtos finais de glicação avançada (AGE, do inglês *advanced glycation-end products*); aumento da atividade da proteína cinase C (PKC) e aumento da ativação da via da hexosamina. Estes efeitos, aparentemente, atuam como consequência da produção exacerbada de superóxido, uma espécie reativa de oxigênio (EROs) proveniente do transporte de elétron da cadeia respiratória mitocondrial (7, 27).

A via dos polióis é responsável pela conversão da glicose em sorbitol através da enzima aldose redutase. Como esta enzima tem uma baixa afinidade pela glicose, em condições de euglicemia este açúcar é pouco utilizado nesta via, contudo em condições hiperglicemiantes sua conversão para sorbitol é aumentada com consequente diminuição de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio (NADPH), um co-fator utilizado pela enzima aldose redutase (Figura 1) (7). O co-fator NADPH é utilizado pela enzima glutatona redutase para regeneração do antioxidante glutatona (GSH) em sua forma oxidada para a forma reduzida (28). Ratos transgênicos super expressando aldose redutase tiveram suas concentrações de GSH na retina diminuídas

com consequente aumento do estresse oxidativo em condições hiperglicemiantes, enquanto sob condições normais esta característica não foi observada (29), demonstrando que a via dos polióis contribui para a geração de EROs, em especial o superóxido, durante um quadro hiperglicêmico.

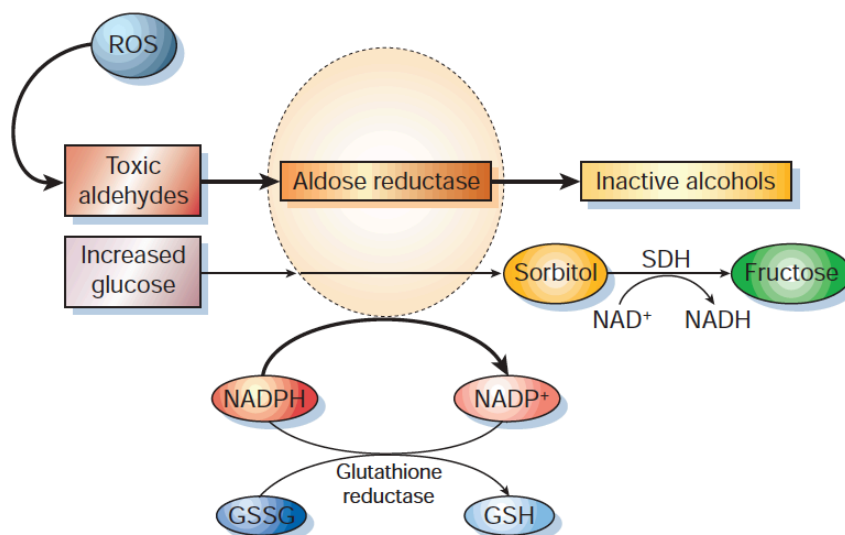


Figura 1 – Aldose reductase e a via dos polióis. *Nature* 414:813-820, 2001. NAD: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina; NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina hidreto; NADPH: nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio; NADP<sup>+</sup>: nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato; GSH: glutatona; GSSG: glutatona oxidada; SDH: sorbitol desidrogenase.

A glicose é considerada o produto inicial da formação dos AGEs e a hiperglicemia, o evento desencadeante (30). A produção dos AGEs pode ocorrer principalmente de três formas: auto-oxidação intracelular da glicose para glioxal; decomposição dos produtos de Amadori para 3-desoxiglucosona e fragmentação do gliceraldeído 3-fosfato e da dihidroxiacetona para o metilglioxal. Estes três compostos (metilglioxal, glioxal e 3-desoxiglucosona) sofrem reações não enzimáticas com o grupo amina de proteínas para formar os AGEs (7, 30).

Os AGEs podem se acumular em diversos órgãos e contribuir para a formação das complicações diabéticas como a ND. Os podócitos, as células mesangiais, a membrana basal do glomérulo e as células renais acumulam grandes quantidades destas

moléculas, que podem contribuir para o desenvolvimento da ND (30). Os AGEs ligam-se a vários receptores, dentre eles o RAGE, que pode gerar diversas reações intracelulares indesejáveis como produção excessiva de EROs e ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios como o NF- $\kappa$ B além; disto, proteínas de matriz extracelular podem ser modificadas por estas moléculas, prejudicando suas funções normais (7). Proteínas da matriz extracelular glicadas provenientes do endoneuro do nervo ciático de ratos diabéticos falharam na regeneração de nervos sensoriais, demonstrando um papel prejudicial dos AGEs na neuropatia diabética (31).

A produção intracelular de precursores de AGEs podem danificar as células de três maneiras diferentes: (1) as proteínas intracelulares podem ser modificadas pelos AGEs, ou seus precursores, modificando suas funções; (2) componentes da matriz extracelular modificados pelos precursores de AGEs interagem de maneira inadequada com outros componentes de matriz ou ainda com receptores para proteínas da matriz, como as integrinas; (3) proteínas plasmáticas modificadas pelos precursores dos AGEs ligam-se aos receptores dos AGEs na membrana plasmática de células endoteliais, mesangiais, macrófagos induzindo a produção de EROs. (7) (Figura 2).

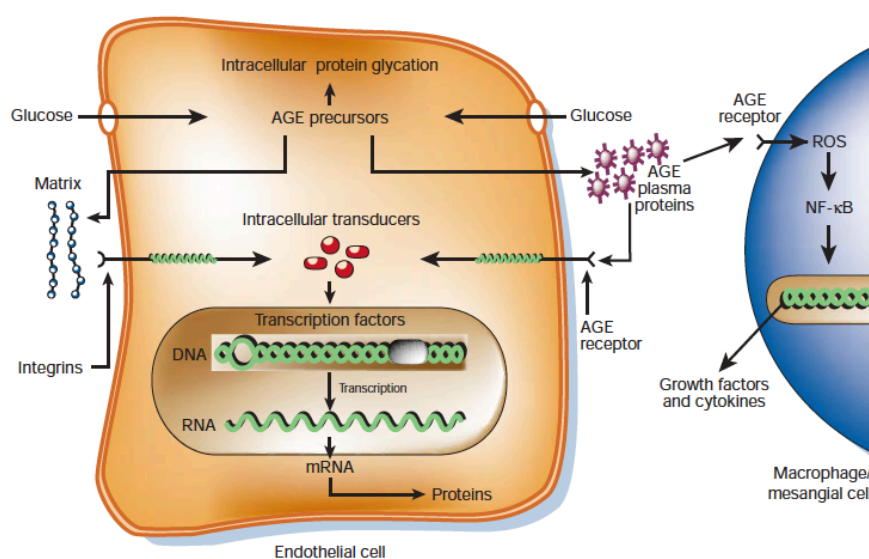


Figura 2 – Mecanismos pelo qual a produção intracelular de produtos finais de glicação avançada danifica células vasculares. *Nature* 414:813-820, 2001. AGE: produto final de glicação avançada; ROS: espécies reativas de oxigênio; DNA: ácido desoxirribonucleico; RNA: ácido ribonucleico.

A PKC é uma importante proteína cinase responsável pela transdução de sinais de diversas vias metabólicas através da transferência de um grupo fosfato do ATP para outras proteínas (27). O principal ativador da PKC é o diacilglicerol (DAG) e uma síntese *de novo* deste composto parece ocorrer em pacientes com hiperglicemia, por meio da redução do glicerol-3-fosfato para dihidroxiacetona e posterior acetilação deste composto. A ativação da PKC resulta em diminuição da produção de óxido nítrico (NO), aumento da atividade da endotelina-1, alteração na expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), do fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e do inibidor do plasminogênio ativado 1 (PAI-1) e ainda ativação do NF- $\kappa$ B e da enzima NADPH oxidase (Figura 3) (7, 27, 32).

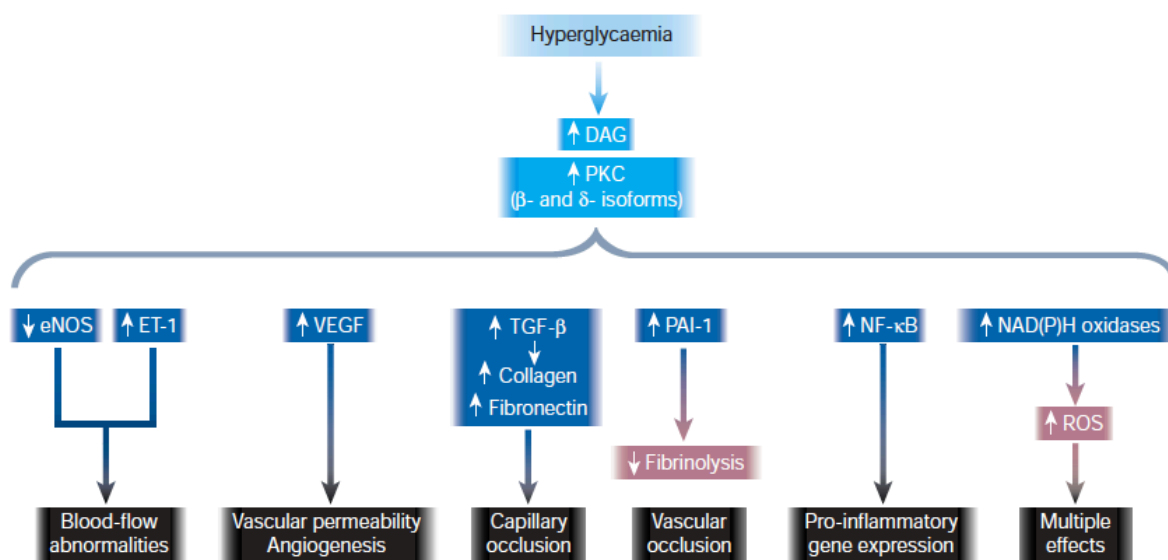


Figura 3 – Consequências da ativação da proteína cinase C (PKC) pelo processo de hiperglicemia. *Nature* 414:813-820, 2001. DAG: diacilglicerol; PKC: proteína cinase C; eNOS: óxido nítrico sintetase endotelial; ET-1: endotelina 1; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial; TGF- $\beta$ : fator de crescimento tumoral-beta; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio 1; NF- $\kappa$ B: fator nuclear  $\kappa$ B; ROS: espécies reativas de oxigênio; NADP(H): nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio.

A via da hexosamina decorre da transformação da frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato e posteriormente, uridina difosfato-N-acetil glicosamina (UDPGlcNAc). Muitos fatores de transcrição parecem sofrer algum tipo de modificação pela GlcNAc tais como Sp1, Pdx-1, c-myc, NF- $\kappa$ B e STAT5 (33). Uma maior ativação,

porém não uma maior produção, do fator de transcrição Sp1 que promove a transcrição do gene do *PAI-1*, parece ocorrer sob estímulo da glicose em células mesangiais glomerulares. Da mesma forma, uma super expressão de O-GlcNAcase, que previne a GlcNAcilação, diminui a expressão de Sp1 e de PAI-1, demonstrando a importância desta via e destes metabólitos na ativação de proteínas envolvidas com as complicações diabéticas (Figura 4) (34).

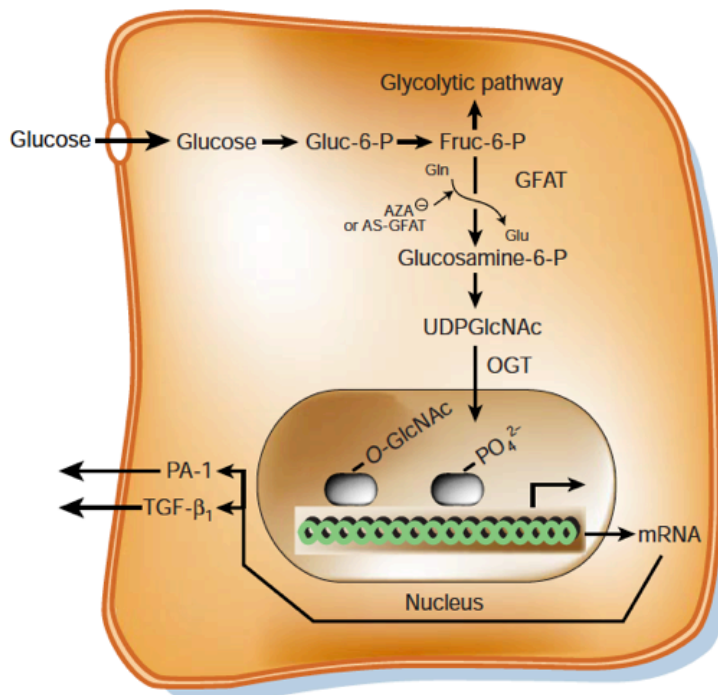


Figura 4 – Via das hexosaminas e o efeito da N-acetilglicosaminação na ativação de fatores de transcrição. *Nature* 414:813-820, 2001. Gluc-6-P: glicose-6-fosfato; Fruc-6-P: frutose-6-fosfato; GFAT: glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase; AZA: azaserina; AS-GFAT: antisense da GFAT; GlcNAc: N-acetilglicosamina; TGF- $\beta$ : fator de crescimento tumoral-beta; Glu: glicose; Gln: glicosamina; OGT: O-linked N-acetilglicosamina.

Tem sido proposto que os mecanismos descritos acima são oriundos de um único processo que ocorre no interior da mitocôndria: a produção exacerbada de radical superóxido durante o processo de transporte de elétrons mitocondrial induzida pela hiperglicemia (7, 27, 32). A utilização de um inibidor do complexo II da cadeia respiratória, um desacoplador de fosforilação oxidativa, da proteína desacopladora-1 (UCP-1 do inglês *uncoupling protein-1*) e da manganês superóxido desmutase

(MnSOD), reduziu, individualmente, a produção de EROs em células endoteliais de aorta bovina, bem como a atividade da PKC, as concentrações intracelulares de AGEs e de sorbitol. O mesmo trabalho foi capaz de mostrar que a produção de EROs na presença de 30 mM de glicose era proveniente da mitocôndria (35).

Um trabalho semelhante analisou se a produção excessiva de EROs poderia influenciar a via das hexosaminas; constatou-se que condições suprafisiológicas de glicose inibiam a atividade da enzima da via glicolítica gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e que o bloqueio da produção de superóxido pela mitocôndria normalizava sua atividade. A super expressão de UCP-1 e MnSOD também recuperou a atividade da enzima, demonstrando que EROs diminuem a atividade da GAPDH. A via das hexosaminas teve sua função aumentada na presença de 30 mM de glicose e este quadro foi revertido pelo bloqueio da cadeia respiratória mitocondrial e pela super expressão de MnSOD (36).

Estes resultados tomados em conjunto mostram que as quatro principais vias envolvidas nos danos celulares causados pela hiperglicemia são consequência de uma produção excessiva de superóxido pela mitocôndria durante o processo da cadeia respiratória. Essa produção exacerbada de radical superóxido induzida pela hiperglicemia inibe a atividade da GAPDH ocorrendo, como consequência, um acúmulo do gliceraldeído-3-fosfato, que estimula a síntese “*de novo*” de DAG e aumenta a formação de metilglioxal. Além disto, produtos da via glicolítica como a frutose-6-fosfato e até mesmo a glicose podem ser acumulados, proporcionando aumento da atividade da via das hexosaminas e aumento da atividade da via dos polióis, respectivamente. Desta forma, um único mecanismo gerado pelo quadro hiperglicêmico pode ser o responsável por desencadear a ativação das vias clássicas de dano celular induzido pela hiperglicemia (Figura 5) (7, 32).

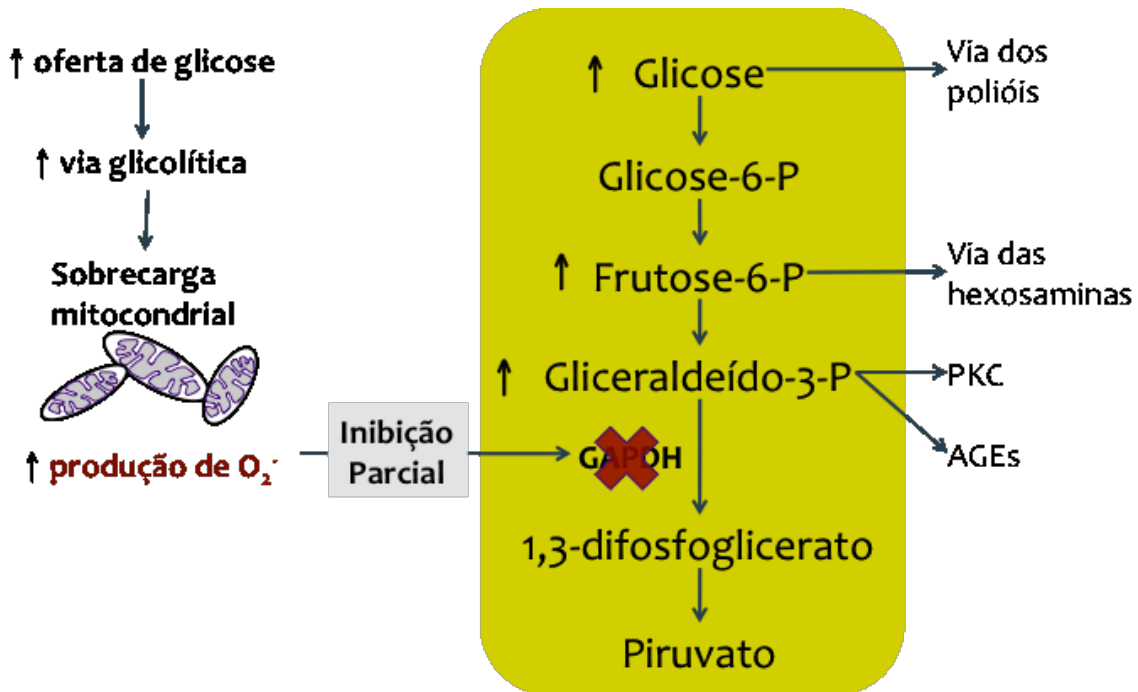


Figura 5 – Mecanismo unificador, no qual a produção excessiva de radical superóxido, em decorrência da hiperglicemia, desencadearia um aumento nas quatro principais vias implicadas na patogênese das complicações crônicas do diabetes.

#### 1.4. Sistemas antioxidantes e pró-oxidantes

Os sistemas enzimáticos e não-enzimáticos de defesa celular contra o estresse oxidativo envolvem vários compostos, entre eles as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase, os sistemas GSH, tioredoxina e glutaredoxina. Há também macromoléculas como albumina e ceruloplasmina e moléculas pequenas como vitamina C e E, beta-caroteno e ácido úrico que participam deste processo (37, 38). Por outro lado, existem sistemas pró-oxidantes que atuam, entre outras coisas, como importantes mecanismos de defesa contra patógenos, mas que quando têm sua atividade exacerbada podem gerar danos celulares, como o sistema NADPH oxidase.



#### 1.4.1 O sistema glutationa

A GSH é um tripeptídeo ubíquo, formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e glutamato, produzido intracelularmente em todos os tipos celulares. Ela apresenta um rápido catabolismo, o que explica a sua baixa concentração extracelular. Intracelularmente, a GSH pode estar presente na sua forma reduzida (GSH), como um monômero, ou em sua forma oxidada, como um dímero dissulfídico (GSSG) (39).

A GSH intracelular pode estar compartimentalizada em diferentes locais, como o citosol, a mitocôndria, o retículo endoplasmático e o núcleo. Dentro de cada compartimento, a GSH pode apresentar taxas específicas de *turnover*, bem como concentrações diferentes de GSH e GSSG (40). Em condições redox normais, a maior parte da glutationa se encontra na sua forma reduzida. Este importante agente antioxidante pode agir principalmente de duas formas: (1) como um ligante direto para radicais livres, como ânion superóxido, radical hidroxila e oxigênio *singlet*, por meio da doação de elétrons e (2) atuar como substrato de outras proteínas, como a GSH peroxidase (GPX) e a GSH S-transferase (GST), durante o processo de detoxificação do peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos lipídicos e componentes eletrofílicos (39, 41).

As GPXs são proteínas responsáveis pela redução de uma grande variedade de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos em seus compostos hidroxil, utilizando para isso a GSH como cofator. Existem diversos tipos de GPXs e todas elas são consideradas selenoproteínas, uma vez que possuem uma selenocisteína na forma de um 21º aminoácido em seu sítio ativo, formado por uma tetra catalítica de selenocisteína, triptofano, glicina e aspargina (42). Durante o ciclo catalítico das GPXs, o selênio presente na selenocisteína é oxidado pelo peróxido em uma forma derivada e ácida do selênio. Quando a GSH é utilizada como cofator, ocorre a formação de um selênio-dissulfeto, que é clivado por uma molécula de GSH para produção da GPX reduzida (41).

A proteína GPX-4 é a única forma monomérica dentre as GPXs. Ela apresenta três isoformas diferentes, todas codificadas pelo mesmo gene, que se localizam no citoplasma, na mitocôndria e no núcleo. Além de sua atividade antioxidante, a proteína GPX-4 também é importante na diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário e na espermatogênese (42). O gene que a codifica apresenta sete éxons e está localizado no braço curto do cromossomo 19 (19p13.3). Diversos polimorfismos no gene *GPX4* já foram identificados e analisados com diferentes desfechos. Em 2002, Villette et al. identificaram um polimorfismo na região 3'UTR do gene *GPX4* (rs713041) que influenciava o metabolismo da lipoxigenase (43). Este polimorfismo também mostrou-se associado com câncer colorretal (44) e sua funcionalidade foi demonstrada por meio de estudos *in vitro* com plasmídeos contendo ambos os possíveis alelos (45, 46). A importância deste polimorfismo deve-se ao fato dele estar localizado próximo ao sítio de incorporação do selênio durante o processo de tradução.

#### 1.4.2 O Sistema Catalase

A catalase é uma enzima codificada pelo gene *CAT*, localizado no cromossomo 11 (p13) e tem a função de catalisar a reação que transforma o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (47, 48). Diversos polimorfismos já foram estudados no gene da catalase, com o intuito de procurar associações com o DM ou com as complicações vasculares decorrentes desta doença (49-52). Como exemplo podemos citar o polimorfismo 21 A>T (rs79433316), que não se mostrou associado com a ND em um estudo realizado na população romena de pacientes com DM1 (51). Outro polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP), o C111T (rs769217) foi avaliado em pacientes com DM1, DM 2 e DM gestacional. Pacientes com DM1 ou DM gestacional apresentaram maior frequência do alelo T do polimorfismo C111T no éxon 9 quando comparados com indivíduos saudáveis, enquanto que pacientes diabéticos tipo 1 ou tipo 2, com o

genótipo XT apresentaram uma diminuição na atividade da enzima presente no sangue (52). O SNP -262 C>T, na região promotora do gene da catalase, não se mostrou associado com as complicações crônicas em pacientes portadores de DM2 (49).

#### 1.4.3. O sistema NADPH

As NADPH oxidases são proteínas que transferem elétrons através de membranas e catalisam a redução dependente de NADPH de  $O_2$  a  $O_2^-$ , gerando EROs. A proteína NOX-2, o protótipo das NADPH oxidases, é responsável pelo *respiratory burst*, que é a produção aumentada de EROs pelos fagócitos após rápido consumo de oxigênio. Esses EROs participam diretamente da defesa do hospedeiro contra bactérias, vírus, protozoários e fungos. Existem, no entanto, outras isoformas de NOX amplamente distribuídas nos tecidos que participam de vários processos fisiológicos e fisiopatológicos (53).

O sistema NADPH oxidase é um complexo enzimático. No caso da NOX-2, é composto de dois componentes de membrana, três componentes citosólicos e um substrato GTPase relacionado a Ras (Rac2). Os componentes de membrana são a subunidade catalítica NOX-2 (ou  $gp91^{phox}$ ) e a subunidade regulatória  $p22^{phox}$ , que formam um heterodímero e se estabilizam mutuamente. A ativação da NOX-2 requer a translocação dos fatores citosólicos  $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  e  $p67^{phox}$  para o complexo que está na membrana. Concomitantemente, Rac se dissocia de um inibidor e é ativado pela troca de GDP por GTP para que ocorra a ativação enzimática e produção de  $O_2^-$  após a transferência de elétron do NADPH para a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e, a seguir para o oxigênio molecular (Figura 6).

A família de proteínas homólogas a NOX-2 fagocítica é composta por sete membros dos quais a proteína NOX-4 é a que parece ter um maior envolvimento com o desenvolvimento da ND (54). Quatro polimorfismos foram detectados na região 5' da

região promotora do gene *NOX4* e o haplótipo GGCC, o qual apresentou uma frequência de 77,6%, conferiu uma *Odds Ratio* (OR) de 2,05 (intervalo de confiança (IC) 95% 1,04-4,06) para ND quando em heterozigose e 2,48 (IC 95% 1,27 – 4,83) quando em homozigose (55).

A enzima NOX-2 é codificada pelo gene *CYBB*, e mutações neste gene causam a doença granulomatosa crônica. Recentemente um estudo foi capaz de demonstrar que camundongos *knockouts* para a enzima NOX-2 tiveram melhoras no quadro de DM induzido por estreptozotocina com diminuição da glicemia, aumento da insulinemia, diminuição da apoptose e aumento da massa das células beta e diminuição da produção de EROs após estimulação com citocinas (56).

A subunidade regulatória *p22<sup>phox</sup>* é responsável pela estabilização do complexo NADPH oxidase formando um heterodímero com as diversas proteínas NOX (exceção feita a NOX-5). Este heterodímeros, chamado de citocromo *b<sub>558</sub>*, parecem ter um grande envolvimento com o desenvolvimento de DM e vários polimorfismos foram detectados em sua região promotora como o C242T (rs4673), -930 A/G (rs9932581) e o -675 T/A (sem rs descrito).

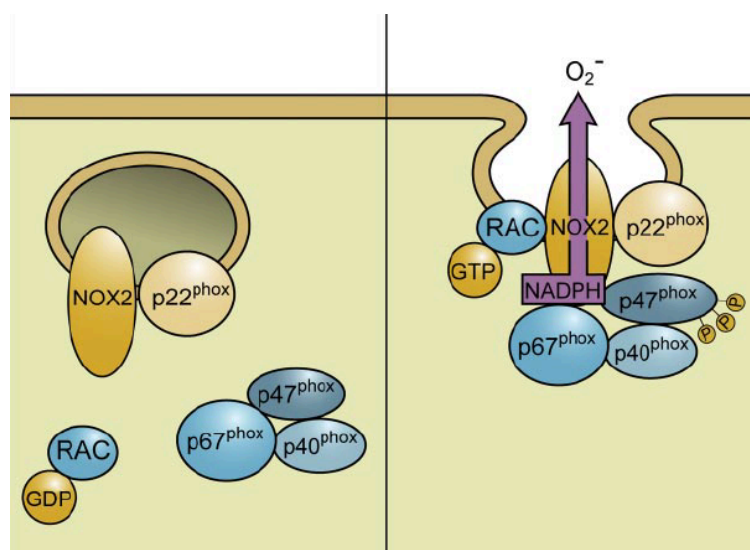


Figura 6 – Sistema NADPH Oxidase e as subunidades que o compõem. Diversas proteínas NOX podem compor este sistema, embora a proteína NOX-2 seja o protótipo das proteínas NOXs e do sistema NADPH Oxidase.

### 1.5. Transportadores de glicose

No néfron, unidade funcional do rim, o glomérulo é responsável pela filtração e o túbulo é responsável pela reabsorção de água e de outros elementos, como a glicose; ele pode ser dividido basicamente em três porções: túbulo contornado proximal, alça de Henle e túbulo contornado distal (57).

Aproximadamente 90% da reabsorção da glicose nos rins ocorre nas células epiteliais do túbulo proximal graças a ação de dois transportadores de glicose: (1) os transportadores facilitados de glicose, também denominados GLUTs e codificados pelo gene *SLC2*; (2) e os cotransportadores de glicose acoplados aos canais de sódio, também denominados SGLTs e codificados pelo gene *SLC5* (58). Embora ambos estejam envolvidos no mecanismo de reabsorção renal da glicose, a localização e a participação de cada um neste processo é diferente.

Os transportadores SGLTs são responsáveis pela captação da glicose para dentro das células epiteliais tubulares sendo expressos na membrana luminal. Por ação da bomba de Na/K ATPase, ocorre a produção de energia através da membrana luminal e o cotransporte de Na<sup>+</sup> e glicose contra um gradiente eletroquímico. Este transporte é função direta da força e da direção do gradiente de Na<sup>+</sup> através da membrana das células epiteliais tubulares renais (58, 59). Dentre os diversos tipos de SGLTs, os de maior importância para a reabsorção da glicose nos rins são os SGLT1 e SGLT2. O SGLT2 é um transportador de baixa afinidade e alta capacidade, expresso em maior quantidade nos segmentos S1 e S2 do túbulo contornado proximal e promove a reabsorção de Na<sup>+</sup> e glicose em uma razão de 1:1. Os 10% de glicose não absorvida será reabsorvida no segmento S3, pelo SGLT1, em uma razão de 2:1 de Na<sup>+</sup> e glicose (57, 60).

Os transportadores de glicose GLUT são responsáveis pelo transporte passivo da glicose presente no interior das células epiteliais tubulares para os vasos sanguíneos. A expressão destes transportadores ocorre na membrana basolateral das células e no

processo de reabsorção renal, assim como ocorre com os SGLTs, dois GLUTs são importantes para a reabsorção da glicose: GLUT1 e GLUT2. O GLUT2 está localizado nos segmentos S1 e S2 do túbulo contornado proximal, transferindo para a corrente circulatória a glicose reabsorvida pelo SGLT2. Na membrana basolateral das células tubulares do segmento S3 do túbulo contornado proximal, são expressos os transportadores GLUT1, que devolvem para a corrente circulatória a glicose reabsorvida pelo SGLT1 (57).

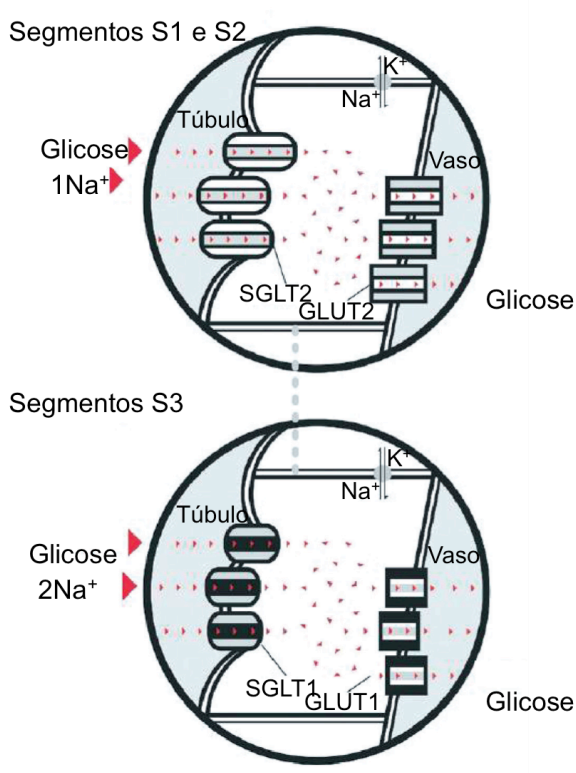


Figura 7 – Reabsorção renal da glicose mediada pelos transportadores de glicose SGLT e GLUT no túbulo contornado proximal.

Até o presente momento 12 tipos diferentes de GLUT e o cotransportador  $\text{H}^+$ -mio-inositol (HMIT) foram descritos como transportadores passivos de glicose. Eles são divididos em três classes de acordo com as suas diferenças estruturais: GLUT1-4 (classe 1); GLUT5, 7, 9 e 11 (classe 2) e GLUT6, 10, 12 e HMIT (classe 3). Os transportadores GLUT possuem em comum a presença de doze domínios transmembrânicos com ambas as extremidades amino- e carboxi-terminal situadas no

citossol e uma única cadeia lateral de *N-linked* oligossacarídeo, situada na primeira (GLUTs de classe 1 e 2) ou na quarta (GLUTs de classe 3) volta extracelular (61).

O principal GLUT envolvido no mecanismo de reabsorção renal da glicose é o GLUT2, um transportador de baixa afinidade, assim como o SGLT2. O GLUT2 é expresso na membrana basolateral das células absorptivas renais e intestinais, na membrana sinusoidal dos hepatócitos e também nos neurônios (62). A expressão de GLUT2 e SGLT2 está aumentada em ratos diabéticos (63, 64), o que acarretaria um aumento de glicose no interior das células tubulares renais e, como consequência, um aumento do estresse oxidativo, participando na etiopatogênese da ND. A expressão de GLUT2 também ocorre na membrana luminal das células tubulares renais de ratos diabéticos (65) e no jejuno de ratos submetidos ao estresse por privação de água (66). Estes achados indicam que frente à situações adversas, a expressão de GLUT2 é induzida na membrana luminal das células tubulares, fazendo com que o transporte passivo da glicose também auxilie no aumento da concentração intracelular deste açúcar. Entretanto este mecanismo parece ser dependente da situação adversa, uma vez que ratos não diabéticos e ratos não submetidos a privação de água não apresentaram expressão de GLUT2 na membrana luminal das células tubulares renais (65, 66). A expressão de GLUT2 na membrana luminal, induzida pela hiperglicemia, parece estar relacionada com um aumento da expressão de PKC  $\beta$ I, uma vez que a incubação de células tubulares com um agonista da PKC aumentou o transporte de glicose mediado por GLUT, mas não por SGLT (67).

Diversos SNPs já foram estudados no gene *SLC2A2*, que codifica o GLUT2 (68-70). O SNP rs5400 é o SNP mais estudado na literatura, principalmente pelo fato de estar localizado em uma região exônica e determinar a troca de uma treonina por uma isoleucina na posição 110 (Thr110Ile). Valores de triglicérides e de HDL também já se

mostraram associados com SNPs no gene *SLC2A2* (69), porém poucos trabalhos analisaram a associação destes SNPs com a ND (71).



## 2. Objetivos

Avaliar em quatro coortes distintas (três coortes de origem francesa e uma coorte de origem brasileira) a associação de polimorfismos de um único nucleotídeo presentes em genes que fazem parte de vias antioxidantes (GSH peroxidase e catalase), pró-oxidantes (NADPH-oxidase) e no gene que codifica o transportador de glicose GLUT2 com doença renal em pacientes portadores de DM1. Os polimorfismos selecionados para o estudo foram:

- *GPX4*: rs713041;
- *CYBB*: rs6610650;
- *CYBA*: rs9932581, rs3794624, rs4673, rs12709102, rs1049255, rs11076692 e -675 A/G (sem rs);
- *CAT*: rs1001179, rs11032699, rs12272630, rs2300182, rs11032703, rs2300181, rs10488736, rs2420388, rs566979, rs7947841 e rs499406;
- *SLC2A2*: rs5400, rs11920090, rs9845527, rs5398, rs11924032, rs11720145.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Pacientes

##### 3.1.1. Coorte SURGENE (*Survival Genetic Nephropathy*)

A coorte *Survival Genetic Nephropathy* (SURGENE) é uma coorte de estudo longitudinal composta por 340 pacientes diabéticos tipo 1 recrutados do Hospital Universitário de Angers, França. Na fase basal 60 (17,7%) eram portadores de ND incipiente, avançada ou estabilizada. Os seguintes critérios de inclusão deveriam ser respeitados: (1) homem ou mulher com DM1 por três ou mais anos; (2) ter sido diagnosticado antes dos 40 anos de idade; (3) não apresentar doença crônica não relacionada ao DM; (4) apresentar qualquer estágio de retinopatia ou nefropatia (exceto terapia de reposição renal). Visitas aos pacientes foram realizadas para medição de peso, pressão arterial (PA), hemoglobina glicada (HbA1c), creatinina plasmática, EUA e exame de fundo do olho (72).

##### 3.1.2. Coorte GENEDIAB

A coorte *Génétique de la Néphropathie Diabétique* (GENEDIAB) consiste de um total 469 pacientes portadores de DM1, diagnosticados antes dos 35 anos de idade e com retinopatia diabética pré-proliferativa (20%) ou proliferativa (80%). Um total de 313 indivíduos (66,7%) apresentavam qualquer grau de ND. Os critérios de inclusão eram os seguintes: (1) ter sido diagnosticado como paciente diabético tipo 1 antes dos 35 anos de idade; (2) apresentar ou ter apresentado retinopatia grave. Os pacientes com câncer foram excluídos. Inicialmente ela foi utilizada como uma coorte de estudo transversal, mas recentemente teve seus dados atualizados, o que proporcionou sua análise, também, de maneira longitudinal. O estudo prospectivo foi conduzido em 242

pacientes, acompanhados até o desenvolvimento de insuficiência renal crônica terminal (IRCT) ou até fevereiro de 2007. O tempo médio de acompanhamento foi de  $8,4 \pm 3,4$  anos e a incidência de novos casos de IRCT foi de 11,2% (73, 74).

### 3.1.3. Coorte GENESIS

A coorte GENESIS possui 636 indivíduos portadores de DM 1, dos quais 316 (49,7%) apresentavam qualquer estágio de ND, atendendo aos seguintes critérios de inclusão: (1) ter sido diagnosticado antes dos 35 anos; (2) ter apresentado cetose inicial e (3) ter necessitado de uso de insulina permanentemente em até 1 ano do diagnóstico (75). Assim como a coorte GENEDIAB, a coorte GENESIS também teve seus dados atualizados e o estudo prospectivo foi conduzido em 503 pacientes, acompanhados até o surgimento de IRCT ou até fevereiro de 2007. O tempo médio de acompanhamento foi de  $6,1 \pm 2,9$  anos e a incidência de novos casos de IRCT foi de 5,6%.

### 3.1.4. Coorte brasileira

A coorte brasileira consiste de 453 pacientes portadores de DM 1 de duração superior há 10 anos recrutados nos Serviços de Endocrinologia e de Diabetes de três hospitais nas cidades de São Paulo (SP), Campinas (SP) e Porto Alegre (RS). O diagnóstico de DM1 foi feito com base na dosagem de auto-anticorpos (descarboxilase do ácido glutâmico [GAD], anticorpos anti-ilhotas [ICA] ou anti *tyrosine phosphatase-like insulinoma antigen 2* [anti-IA-2]) e concentrações indetectáveis de peptídeo-C ou cetoacidose. Pacientes com TFG estimada (TFGe) inferior a  $60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$  que não apresentavam retinopatia, foram excluídos do estudo. Pacientes com diagnóstico de ND incipiente, estabilizada ou avançada, perfizeram um total de 203 indivíduos (45,8%).

### 3.2. Classificação da nefropatia diabética

A TFGe foi calculada de acordo com a fórmula de Modificação da Dieta em Doença Renal (MDRD) (76). A razão albumina/creatinina urinária (ACR) ou a taxa de EUA foram utilizadas na corte brasileira para definir os estágios de ND. Ausência de ND foi definida como ACR <30 mg/g de creatinina ou EUA < 20 µg/min ou < 20 mg/L e creatinina plasmática <1,7 mg/dL; ND incipiente foi definida como microalbuminúria persistente (ACR 30 – 300 mg/g de creatinina ou EUA 20 – 200 µg/min ou 20 – 200 mg/L) e creatinina plasmática <1,7 mg/dL; ND estabilizada foi definida como macroalbuminúria atual ou em algum período da vida (ACR >300 mg/g de creatinina ou EUA >200 µg/min or > 200 mg/L) e creatinina plasmática <1,7 mg/dL e ND avançada foi definida como macroalbuminúria atual ou em algum momento da vida, creatinina plasmática >1,7 mg/dL e qualquer terapia de reposição renal. Nas coortes francesas, os estágios de ND foram definidos de maneira semelhante à descrita anteriormente (77). A EUA foi medida em amostras de urina de 24 horas por imunoturbidimetria e a ACR foi medida em amostras isoladas de urina usando nefelometria, em ao menos duas amostras coletadas nos seis meses prévios à consulta. Os estágios de retinopatia diabética foram determinados de acordo com a classificação de Kohmer como não-proliferativa, pré-proliferativa e proliferativa, com dados obtidos pela fundoscopia e também angiografia (78).

### 3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em Tempo Real

Na coorte brasileira foi utilizado o equipamento de PCR em tempo real, StepOnePlus (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), que permite o processamento de 96 amostras de DNA simultaneamente (em placas). Este ensaio de genotipagem detecta as variantes alélicas de um SNP, sem quantificar o alvo. Para preparação da reação de

PCR, foram utilizados os seguintes reagentes *TaqMan Genotyping Master Mix* (1X), *TaqMan SNP Genotyping Assays* (1X) (Applied Biosystems, CA, EUA) e 1 ng de DNA, q.s.p 10 µL. 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.

Na coorte francesa, a genotipagem foi realizada pelo método competitivo de PCR alelo-específico (KASPar, Kbioscience, Hoddeston, UK). Nesta metodologia, os alelos específicos de cada genótipo estão contidos na sequência do *primer forward*, um para cada genótipo, que contém uma cauda com sequências distintas e únicas, complementares às sequências na qual os fluoróforos estão contidos. A partir do segundo ciclo da PCR, a amplificação proveniente do *primer reverse* gera cópias da sequência da cada de um dos fluoróforos. Conforme a reação vai sendo realizada, a quantidade de amplicons complementares à sequência específica do fluoróforo aumenta, permitindo a detecção pelo aparelho.

### 3.4. Escolha dos polimorfismos

#### 3.4.1 *GPX4* e *CYBB*

Os polimorfismos presentes nos genes *CYBB* e *GPX4* foram selecionados com base em estudos anteriores: o rs6610650 (-2810 A>G) está localizado na região promotora do gene *CYBB*, situado no braço curto do cromossomo X (Xp21.1) e foi reportado estar em desequilíbrio de ligação (DL) com um microssatélite funcional composto por dinucleotídeos de TA (Soares-Souza, 2008). O rs713041 (+718 C>T) está localizado na região 3'UTR do gene *GPX4*, situado no braço curto do cromossomo 19

(19p13.3) e seu impacto na síntese, expressão e função da proteína GPX-4 já foi demonstrado (43-46).

#### 3.4.2 *CAT*

O gene *CAT*, está localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p13) e onze SNPs (rs1001179, rs11032699, rs12272630, rs2300182, rs11032703, rs2300181, rs10488736, rs2420388, rs566979, rs7947841 e rs499406) que capturam ~ 98% de informação sobre as variações alélicas da estrutura haplotípica de *CAT* foram selecionados e genotipados nas coortes francesas. Destes SNPs, o rs5669799 e o rs7947841 foram replicados na coorte brasileira.

#### 3.4.3 *CYBA*

O SNP -675 T/A, localizado na região promotora do gene, foi selecionado com base em trabalhos recentes que demonstraram que o alelo A esta associado com uma menor atividade transcricional do gene *CYBA*, que codifica a proteína  $p22^{phox}$  (79). Estudos prévios de nosso grupo, demonstraram uma associação do alelo raro A deste SNP com uma TFG<sub>e</sub> <60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (80). Além disso, sete SNPs (rs9932581, rs3794624, rs4673, rs12709102, rs1049255 e rs11076692) que capturam 100% da informação sobre as variações alélicas da estrutura haplotípica do *CYBA* foram selecionados para genotipagem nas coortes francesas, perfazendo um total de oito SNPs, localizados no braço longo do cromossomo 16 (16q24).

### 3.4.3 *SLCA2*

O gene *SLC2A2*, que codifica o GLUT2, está localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1) e seis SNPs (rs5400, rs11920090, rs9845527, rs5398, rs11924032, rs11720145) foram selecionados com base em dados utilizados da literatura. Com o auxílio do programa Haploview (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview>) foi possível observar que estes SNPs capturam ~ 94% da informação sobre as variações alélicas da estrutura haplotípica do *SLC2A2*.

### 3.5. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP), exceto quando especificado de outra maneira. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA, teste de chi-quadrado e teste exato de Fischer. Após a genotipagem, a análise de Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) foi realizada em todos os grupos estudados ao nível de significância de 0,001 e SNPs que falharam neste teste não foram utilizados nas análises de prevalência com relação aos estados de ND, apenas com relação a TFG<sub>e</sub>, por tratar-se de uma variável contínua e, portanto, menos afetada pela ausência de EHW. A associação dos SNPs com a TFG<sub>e</sub> foi realizada por meio da análise de ANCOVA, ajustada para eventuais co-variáveis. A associação dos SNPs com a ND foi verificada por modelos de regressão. A análise de regressão de risco proporcional de Cox foi utilizada para avaliar o efeito dos SNPs sobre a incidência de eventos renais (definidos como progressão para ND incipiente ou para um estágio mais avançado de ND) ou IRCT, para as coortes SURGENE e GENESIS/GENEDIAB, respectivamente, ao longo do tempo nos estudos prospectivos. Para as análises

transversais, foi utilizado o modelo de regressão logística nominal politômica, tendo como categoria de referência a ausência de ND.

Os resultados foram expressos de acordo com o *Hazard ratio* (HR), para o modelo de Cox, e *Odds Ratio* (OR) para cada estágio de ND *versus* ausência de ND no modelo de regressão logística nominal, juntamente com seus respectivos intervalos de confiança (IC) de 95%. Para os modelos dominante e recessivo, HR e, também, OR foram considerados como 1. Para o modelo co-dominante, os dados dos genótipos foram classificados de acordo com o número de alelos polimórficos (0; 1 ou 2) e o HR e o OR foram computados para o número de alelos polimórficos como variáveis quantitativas (1 vs. 0 e 2 vs. 1 cópias, com o menor número de cópias de cada par considerado como apresentando um OR de 1). Quando utilizada, a interação entre sexo e genótipo foi avaliada mediante a inclusão no modelo de regressão de uma co-variável composta “cruzada” (sexo/genótipo). Os efeitos relacionados ao genótipo foram então realizados pela nidificação da variável genótipo dentro da variável sexo resultando no cálculo dos efeitos estatísticos para homens e mulheres separadamente e ajustado para comparações múltiplas, devido à estratificação por sexo.

Ajustes para outras variáveis clínicas e biológicas foram realizados mediante a inclusão dessas variáveis como co-variáveis no modelo de regressão. Os dados que apresentaram rejeição da normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk*  $W$  foram logaritmizados para as análises. A correção para múltiplas comparações devido aos múltiplos *SNPs* testados foi feita para cada estudo, separadamente, de acordo com o número independente efetivo de testes ( $M_{\text{eff}}$ ) baseado no grau de DL existente entre os *SNPs* pertencentes a um mesmo gene (*SNPs* no gene *CYBA*, *CAT* e *SLC2A2*) (81) e pela correção de Bonferroni no caso de polimorfismos em genes diferentes (*GPX4* e *CYBB*). Desta forma, foi considerado significativo  $p < 0,025$  para as análises na coorte brasileira;



$p < 0,025$  ,  $p < 0,02$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,03$  para as análises de *GPX4/CYBB*, *CAT*, *CYBA* e *SLCA2*, respectivamente nas coortes francesas, a menos que outro valores tenham sido especificados. O poder para detectar associações nos genes *GPX4* e *CYBB* com a prevalência de ND estabilizada e avançada foi de  $\sim 0,60$  e  $\sim 0,90$  para as coortes brasileira e francesas, respectivamente. Com relação ao gene *CAT*, o poder para detectar associações com a prevalência ou incidência de ND estabilizada/avançada para as coortes SURGENE e GENEDIAB foi de 0,51 e 0,75, e 0,90 e 0,82, respectivamente. No gene *CYBA* o poder para detectar associações com a prevalência ou incidência de ND estabilizada/avançada para as coortes SURGENE e GENESIS/GENEDIAB foi de 0,43 e 0,79, e 0,89 e 0,50, respectivamente. No gene *SLCA2* o poder para detectar associações com a prevalência ou a incidência de ND estabilizada/avançada para as coortes SURGENE e GENESIS/GENEDIAB foi de 0,46 e 0,72, e 0,91 e 0,41, respectivamente, para um OR ou HR  $\geq 1,5$  e  $p = 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas com o *software JMP (SAS Institute, Cary, NC)* e *software* de livre distribuição R, utilizado também para o cálculo do DL e elaboração dos gráficos (82).

## 4. Resultados

### 4.1. Características Clínicas

A Tabela 1 mostra os dados clínicos dos pacientes para cada uma das quatro coortes estudadas. Pode-se perceber a diferença com relação aos critérios de inclusão de cada coorte. A coorte SURGENE, por ser um estudo prospectivo, apresenta pacientes com menos complicações e com um tempo de DM menor que as outras coortes. Outra ressalva é feita à respeito dos graus de retinopatia diabética nas coortes GENEDIAB e GENESIS. É possível observar que na coorte GENEDIAB, os pacientes possuem graus mais graves de retinopatia diabética, enquanto que na coorte GENESIS, apesar de não haver nenhum paciente sem retinopatia diabética, alguns pacientes possuem retinopatia diabética não-proliferativa.

#### 4.1.1. Coorte SURGENE

As características clínicas dos pacientes na fase basal são exibidas na Tabela 2. A prevalência de ND incipiente, estabilizada e avançada foi de 10,6%, 5,3%, 1,7%, respectivamente. Os pacientes com graus mais graves de ND eram mais velhos, com mais tempo de DM, valores mais elevados de PA, diminuição da função renal e faziam mais uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) e de medicamentos anti-hipertensivos.

A incidência de eventos renais (definidos como novos casos de microalbuminúria ou progressão para estágios mais graves de ND) durante o período de estudo foi de 28,8%. A Tabela 3 mostra os dados clínicos dos pacientes na fase basal, de acordo com a incidência de eventos renais durante o acompanhamento. Pacientes que desenvolveram algum evento renal tinham mais tempo de DM, apresentaram maiores

valores de PA e HbA1c, diminuição da função renal, faziam mais uso de IECA e medicamentos anti-hipertensivos. Retinopatia diabética foi mais frequente e grave nos pacientes que tiveram evento renal.

#### *4.1.2. Coorte GENESIS/GENEDIAB*

As características clínicas das coortes GENESIS e GENEDIAB são exibidas nas Tabelas 4 e Tabela 5, respectivamente. A prevalência de ND incipiente, estabilizada e avançada foi de 21,5%, 23,2%, 22,0%, respectivamente, na coorte GENEDIAB; 20,1%, 15,6%, 14,0%, respectivamente, na coorte GENESIS; 20,7%, 18,8% e 17,4%, respectivamente, no estudo combinado. Pacientes com ND estabilizada ou avançada, em ambas as coortes, tiveram maiores valores de PA, diminuição da função renal e faziam mais uso de IECA e, na coorte GENEDIAB, de medicamentos anti-hipertensivos. Como ter um grau avançado de retinopatia diabética era critério de inclusão na coorte GENEDIAB, a gravidade da retinopatia diabética aumentou conforme a gravidade da ND apenas na coorte GENESIS.

No estudo prospectivo, a incidência de IRCT durante o acompanhamento foi de 7,4%, quando consideradas ambas as coortes, 11,2% para GENEDIAB e 5,6% para GENESIS. A Tabela 3 mostra as características clínicas dos pacientes na fase basal de acordo com o desenvolvimento de IRCT durante o período de seguimento do estudo. Na fase basal, os pacientes que desenvolveram IRCT eram mais novos, com menos tempo de DM, maiores valores de PA, HbA1c e albuminúria, faziam mais uso de IECA e de medicamentos anti-hipertensivos, além de terem uma menor TFGe .

#### *4.1.3. Coorte brasileira*

As características clínicas dos pacientes estudados na coorte brasileira de acordo com os estágios da ND, estão presentes na Tabela 6. Indivíduos com ND estabilizada ou avançada, quando comparados com aqueles com ausência de ND, tiveram maiores valores pressóricos, maiores valores de colesterol, triglicérides, faziam mais uso de medicamentos hipolipemiantes e possuíam uma diminuição da função renal. A retinopatia diabética aumentou em gravidade e frequência conforme a piora da gravidade da ND.

**Tabela 1 – Características clínicas das quatro coortes estudadas.**

<b>Características</b>	<b>SURGENE</b>	<b>GENEDIAB</b>	<b>GENESIS</b>	<b>Coorte brasileira</b>
N	340	469	636	453
Sexo				
Feminino (%)	45	44	48	57
Masculino (%)	55	56	52	43
Idade (anos)	33 ± 13	45 ± 12	42 ± 11	36 ± 11
Idade ao diagnóstico (anos)	18 ± 10	19 ± 9	16 ± 9	14 ± 8
Tempo de DM (anos)	15 ± 11	28 ± 10	27 ± 9	22 ± 8
HbA1c (%)	9,3 ± 2,3	8,6 ± 1,8	8,5 ± 1,34	8,8 ± 2,1
PAS (mmHg)	127 ± 16	138 ± 19	132 ± 19	122 ± 19
PAD (mmHg)	73 ± 11	79 ± 12	75 ± 10	77 ± 12
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,92 ± 0,27	1,42 ± 1,30	1,27 ± 1,36	1,46 ± 1,69
TFGe (ml.min-1/1,73 m <sup>2</sup> )	96 ± 24	71 ± 30	88 ± 52	79 ± 35
Uso de IECA (%)				
Sim	8	44	37	24
Não	92	56	63	76
Tratamento anti-hipertensivo (%)				
Sim	12	55	50	-
Não	88	45	50	-
Estágios de nefropatia diabética (%)				
Ausência	82,3	33,3	50,3	55,2
Incipiente	10,6	21,5	20,1	18,1
Estabilizada	5,3	23,2	15,6	12,1
Avançada	1,8	22,0	14,0	15,6
Estágios de retinopatia diabética (%)				
Ausência	61,8	0	0	35,7
Não proliferativa	15,0	0	42,8	21,4
Pré-proliferativa	12,6	20,4	15,4	5,4
Proliferativa	10,6	79,6	41,8	37,5
HAS (%)				
Sim	-	-	-	46
Não	-	-	-	54

Resultados expressos como média ± DP.

Pressão Arterial: pressão arterial sistólica (PAS) >140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) >90 mmHg ou presença de medicamento anti-hipertensivos e história de hipertensão. IECA: inibidor da enzima conversora da angiotensina; HAS: hipertensão arterial sistêmica; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada.

**Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes da coorte SURGENE de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal**

	Ausência de nefropatia	Nefropatia incipiente	Nefropatia estabelecida	Nefropatia avançada	p
N	280	36	18	6	
Idade (anos)	32 ± 13	36 ± 14	43 ± 14 <sup>a</sup>	49 ± 13 <sup>a</sup>	<0,0001
Sexo: M/F (%)	56 / 44	50 / 50	67 / 33	83 / 17	0,37
Idade ao diagnóstico (anos)	19 ± 9	18 ± 10	17 ± 10	23 ± 13	0,71
Tempo de DM	13 ± 11	18 ± 9 <sup>a</sup>	26 ± 9 <sup>a</sup>	27 ± 6 <sup>a</sup>	<0,0001
HbA <sub>1c</sub> (%)	8,6 ± 1,8	8,8 ± 1,8	8,9 ± 1,7	9,3 ± 1,1	0,52
PAS (mmHg)	123 ± 13	133 ± 15 <sup>a</sup>	156 ± 20 <sup>a,b</sup>	153 ± 16 <sup>a,b</sup>	<0,0001
PAD (mmHg)	71 ± 9	72 ± 10 <sup>a</sup>	90 ± 11 <sup>a,b</sup>	89 ± 6 <sup>a,b</sup>	<0,0001
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,88 ± 0,16	0,87 ± 0,20	1,18 ± 0,27 <sup>a,b</sup>	2,33 ± 0,43 <sup>a,b,c</sup>	<0,0001
TFGe (ml.min <sup>-1</sup> /1,73m <sup>2</sup> )	99 ± 20	99 ± 31	71 ± 23 <sup>a,b</sup>	32 ± 7 <sup>a,b,c</sup>	<0,0001
Uso de IECA (%)	1	28	72	67	<0,0001
Tratamento anti-hipertensivo (%)	3	36	94	67	<0,0001
Estágios de retinopatia diabética (%)	69 / 16 / 10 / 5	44 / 17 / 14 / 25	0 / 5 / 50 / 44	0 / 0 / 33 / 67	<0,0001

Resultados expressos como média ± DP. Análise estatística das variáveis realizadas com o teste de ANOVA utilizando dados logaritmizados. Variáveis com diferença estatística foram submetidas ao pós teste de Tukey-Kramer-HSD: diferença significativa entre pacientes com ausência de nefropatia (a) ou nefropatia incipiente (b) ou nefropatia estabelecida (c).

Pressão Arterial: pressão arterial sistólica (PAS) >140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) >90 mmHg ou presença de medicamento anti-hipertensivos e história de hipertensão. IECA: inibidor da enzima conversora da angiotensina; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; Estágios de retinopatia diabética: Ausência; Não Proliferativa; Pré-Proliferativa; Proliferativa.

p≤0,05 foi considerado significativo.

**Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes na fase basal pela incidência de eventos renais (coorte SURGENE) ou insuficiência renal crônica terminal (GENESIS/GENEDIAB) durante o acompanhamento do estudo.**

	Coorte SURGENE: incidência de eventos renais			Coorte GENESIS/GENEDIAB: incidência de insuficiência renal crônica terminal		
	Não	Sim	p	Não	Sim	p
N	242	98		681	55	
Idade (anos)	33 ± 13	35 ± 14	0,24	44 ± 12	39 ± 11	0,002
Sexo (H/M) (%)	46 / 54	36 / 64	0,08	55 / 45	56 / 44	0,89
Idade ao diagnóstico (anos)	19 ± 10	18 ± 9	0,50	16 ± 9	14 ± 9	0,09
Tempo de DM (anos)	14 ± 11	17 ± 11	0,001	28 ± 9	25 ± 10	0,04
HbA <sub>1c</sub> (%)	9,2 ± 2,3	9,7 ± 2,3	0,04	8,5 ± 1,4	9,1 ± 1,9	0,009
PAS (mmHg)	124 ± 14	134 ± 18	<0,0001	132 ± 18	151 ± 19	<0,0001
PAD (mmHg)	72 ± 10	75 ± 12	0,002	75 ± 10	88 ± 11	<0,0001
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,89 ± 0,23	1,00 ± 0,35	0,001	0,98 ± 0,41	2,39 ± 1,55	<0,0001
TFGe (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	98 ± 23	91 ± 26	0,01	92 ± 44	46 ± 47	<0,0001
Albuminúria (mg/l)	7 (2 – 41)	10 (3 – 478)	0,002	16 (3 – 676)	2.218 (152 – 5.119)	<0,0001
Uso de IECA (%)	6	16	0,0025	38	64	0,0003
Tratamento anti-hipertensivo (%)	8	26	<0,0001	49	85	<0,0001
Estágios de retinopatia diabética (%)	67 / 14 / 12 / 7	45 / 18 / 17 / 20	0,0002	0 / 34 / 18 / 48	0 / 7 / 16 / 76	<0,0001

Resultados são expressos como média ± DP, exceto albuminúria, expressa como mediana (10% - 90%). A estatística das variáveis quantitativas foi realizada com ANOVA como variáveis logaritmizadas, ou Wilcoxon (albuminúria).

Pressão Arterial: pressão arterial sistólica (PAS) >140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) >90 mmHg ou presença de medicamento anti-hipertensivos e história de hipertensão. IECA: inibidor da enzima conversora da angiotensina; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; Estágios de retinopatia diabética: Ausência; Não Proliferativa; Pré-Proliferativa; Proliferativa. p≤0,05 foi considerado significativo.

**Tabela 4 - Características clínicas dos pacientes da coorte GENESIS de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal.**

	<b>Ausência de nefropatia</b>	<b>Nefropatia incipiente</b>	<b>Nefropatia estabelecida</b>	<b>Nefropatia avançada</b>	<b><i>p</i></b>
N	320	128	99	89	
Idade (Anos)	44 ± 11	40 ± 11 <sup>a</sup>	41 ± 11 <sup>a</sup>	42 ± 10	0,0009
Sexo: M/F (%)	49 / 51	55 / 45	48 / 52	60 / 40	0,24
Idade ao diagnóstico (Anos)	16 ± 10	16 ± 9	14 ± 9	15 ± 9	0,28
Tempo de DM (Anos)	28 ± 9	23 ± 9 <sup>a</sup>	26 ± 9 <sup>b</sup>	28 ± 9 <sup>b</sup>	<0,0001
HbA <sub>1c</sub> (%)	8,4 ± 1,2	8,7 ± 1,2	8,8 ± 1,7 <sup>a</sup>	8,5 ± 1,5	0,04
PAS (mmHg)	127 ± 16	132 ± 18 <sup>a</sup>	135 ± 19 <sup>a</sup>	146 ± 25 <sup>a,b,c</sup>	<0,0001
PAD (mmHg)	73 ± 9	76 ± 9 <sup>a</sup>	78 ± 10 <sup>a</sup>	82 ± 12 <sup>a,b,c</sup>	<0,0001
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,86 ± 0,25	0,87 ± 0,26	1,08 ± 0,36 <sup>a,b</sup>	3,52 ± 2,58 <sup>a,b,c</sup>	<0,0001
TFGe (ml.min <sup>-1</sup> /1.73m <sup>2</sup> )	100 ± 48	105 ± 50	83 ± 48 <sup>a,b</sup>	30 ± 21 <sup>a,b,c</sup>	<0,0001
Albuminúria (mg/L)	8 (3 – 20)	48 (23 – 161) <sup>a</sup>	605 (161 – 2150) <sup>a,b</sup>	1500 (9 – 5778) <sup>a,b</sup>	<0,0001
Uso de IECA (%)	13	50	77	57	<0,0001
Tratamento anti-hipertensivo (%)	25	60	89	84	<0,0001
Estágios de retinopatia diabética (%)	0 / 57 / 16 / 27	0 / 44 / 20 / 36	0 / 25 / 12 / 53	0 / 9 / 11 / 80	<0,0001

Resultados expressos como média ± DP, exceto albuminúria expressa como mediana (10% - 90%). Análise estatística das variáveis correspondem ao teste de ANOVA realizado com dados logaritmizados ou Wilcoxon (Albuminúria). Variáveis com diferença estatística foram submetidas ao pós teste de Tukey-Kramer-HSD ou Dunns: diferença significativa entre pacientes com ausência de nefropatia (a) ou nefropatia incipiente (b) ou nefropatia estabelecida (c).

Pressão Arterial: pressão arterial sistólica (PAS) >140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) >90 mmHg ou presença de medicamento anti-hipertensivos e história de hipertensão. IECA: inibidor da enzima conversora da angiotensina; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; Estágios de retinopatia diabética: Ausência; Não Proliferativa; Pré-Proliferativa; Proliferativa.  $p \leq 0,05$  foi considerado significante.



**Tabela 5 - Características clínicas dos pacientes da coorte GENEDIAB de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal**

	<b>Ausência de nefropatia</b>	<b>Nefropatia incipiente</b>	<b>Nefropatia estabelecida</b>	<b>Nefropatia avançada</b>	<b>p</b>
N	156	101	109	103	
Idade (Anos)	47 ± 13	44 ± 14	43 ± 12 <sup>a</sup>	44 ± 11	0,04
Sexo: M/F (%)	52 / 48	59 / 41	55 / 45	58 / 42	0,62
Idade ao diagnóstico (Anos)	16 ± 9	17 ± 10	15 ± 8	15 ± 8	0,98
Tempo de DM (Anos)	30 ± 10	27 ± 10 <sup>a</sup>	27 ± 9	29 ± 9	0,05
HbA <sub>1c</sub> (%)	8,3 ± 1,6	8,6 ± 1,9	9,0 ± 2,1	8,5 ± 1,6	0,07
PAS (mmHg)	129 ± 14	137 ± 18 <sup>a</sup>	142 ± 18 <sup>a</sup>	148 ± 20 <sup>a,b</sup>	<0,0001
PAD (mmHg)	73 ± 9	79 ± 12 <sup>a</sup>	83 ± 11 <sup>a,b</sup>	85 ± 11 <sup>a,b</sup>	<0,0001
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,92 ± 0,20	0,97 ± 0,20	1,16 ± 0,24 <sup>a,b</sup>	2,87 ± 2,19 <sup>a,b,c</sup>	<0,0001
TFGe (ml.min <sup>-1</sup> /1.73m <sup>2</sup> )	87 ± 26	85 ± 21	69 ± 21 <sup>a,b</sup>	34 ± 17 <sup>a,b,c</sup>	<0,0001
Albuminúria (mg/L)	6 (2 – 19)	32 (3 – 104) <sup>a</sup>	596 (57 – 2546) <sup>a,b</sup>	496 (3 – 3016) <sup>a,b</sup>	<0,0001
Uso de IECA (%)	15	43	69	60	<0,0001
Tratamento anti-hipertensivo (%)	25	51	75	84	<0,0001
Estágios de retinopatia diabética (%)	0 / 0 / 21 / 79	0 / 0 / 26 / 74	0 / 0 / 22 / 78	0 / 0 / 12 / 88	0,08

Resultados expressos como média ± DP, exceto albuminúria expressa como mediana (10% - 90%). Análise estatística das variáveis correspondem ao teste de ANOVA realizado com dados logaritmizados ou Wilcoxon (Albuminúria). Variáveis com diferença estatística foram submetidas ao pós teste de Tukey-Kramer-HSD ou Dunns: diferença significativa entre pacientes com ausência de nefropatia (a) ou nefropatia incipiente (b) ou nefropatia estabelecida (c).

Pressão Arterial: pressão arterial sistólica (PAS) >140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) >90 mmHg ou presença de medicamento anti-hipertensivos e história de hipertensão.

Estágios de retinopatia diabética: Ausência; Não Proliferativa; Pré-Proliferativa; Proliferativa.

$p \leq 0,05$  foi considerado significante.

**Tabela 6 - Características clínicas dos pacientes da coorte brasileira de acordo com os estágios de nefropatia diabética.**

	Ausência de nefropatia	Nefropatia incipiente	Nefropatia estabilizada	Nefropatia avançada	<i>P</i>
N	250	82	56	63	
Idade (anos)	36 ± 12	36 ± 11	34 ± 9	36 ± 9	0,69
Sexo: M/F (%)	38 / 62	46 / 54	54 / 46	49 / 51	0,07
Idade ao diagnóstico (anos)	14 ± 9	13 ± 7	15 ± 8	13 ± 7	0,19
Tempo de DM (anos)	22 ± 8	24 ± 10	20 ± 5	22 ± 6	0,09
HbA <sub>1c</sub> (%)	8,7 ± 1,9	8,8 ± 1,9	9,3 ± 2,6	8,7 ± 2,4	0,33
PAS (mmHg)	118 ± 15	120 ± 19	126 ± 21 <sup>a</sup>	134 ± 28 <sup>a,b</sup>	<0,0001
PAD (mmHg)	76 ± 10	77 ± 11	83 ± 15 <sup>a</sup>	84 ± 16 <sup>a,b</sup>	<0,0001
HAS (%)	34	46	53	85	<0,0001
Creatinina plasmática (µmol/L)	0,91 ± 0,37	0,98 ± 20	1,08 ± 0,28 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,28 <sup>a</sup>	<0,0001
TFGe (ml.min <sup>-1</sup> /1.73m <sup>2</sup> )	93 ± 27	83 ± 21	79 ± 30 <sup>a</sup>	25 ± 17 <sup>a,b,c</sup>	<0,0001
Uso de IECA (%)	19	43	30	29	0,0002
Colesterol total (mg/dL)	178 ± 35	169 ± 36	204 ± 62 <sup>a,b</sup>	188 ± 68	0,0006
LDL Colesterol (mg/dL)	99 ± 27	94 ± 25	118 ± 57	104 ± 60	0,0764
HDL Colesterol (mg/dL)	61 ± 17	57 ± 20	61 ± 18	58 ± 22	0,0880
Triglicérides (mg/dL)	85 ± 51	98 ± 58	124 ± 72 <sup>a</sup>	151 ± 118 <sup>a,b</sup>	<0,0001
Uso de hipolipemiantes (%)	17	25	31	34	0,0089
Estágios de retinopatia diabética (%)	51 / 24 / 5 / 20	33 / 16 / 6 / 45	12 / 33 / 8 / 47	2 / 9 / 3 / 86	<0,0001

Resultados expressos como média ± DP. Análise estatística das variáveis correspondem ao teste de ANOVA realizado com dados logaritmizados. Variáveis com diferença estatística foram submetidas ao pós teste de Tukey-Kramer-HSD: diferença significativa entre pacientes com ausência de nefropatia (a) ou nefropatia incipiente (b) ou nefropatia estabelecida (c).

Pressão Arterial: pressão arterial sistólica (PAS) >140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) >90 mmHg ou presença de medicamento anti-hipertensivos e história de hipertensão. IECA: inibidor da enzima conversora da angiotensina; HAS: hipertensão arterial sistêmica; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; Estágios de retinopatia diabética: Ausência; Não Proliferativa; Pré-Proliferativa; Proliferativa.

p≤0,05 foi considerado significante

## 4.2. *GPX4*

Os resultados exibidos para o SNP neste gene geraram uma publicação no periódico *Free Radical Research* (ANEXO L). O polimorfismo rs713041 não apresentou associação com nenhum desfecho estudado (ND ou TFGe) quando analisado na população total. Entretanto, quando a população foi estratificada por sexo, este SNP mostrou-se associado com a doença renal diabética no sexo masculino. Dessa forma as análises nas coortes francesas e brasileiras foram feitas para ambos os sexos separadamente, como descrito no item 2.6 da metodologia.

Os dados obtidos na coorte SURGENE não são mostrados, pois nenhuma associação foi observada para este polimorfismo com a prevalência dos estágios da ND, nem com a incidência de eventos renais.

### 4.2.1. Coorte GENESIS/GENEDIAB

Nenhuma associação com qualquer estágio de ND foi observada para o SNP rs713041 no gene *GPX4* tanto no grupo das mulheres quanto no grupo dos homens. Todavia, em homens, observou-se a associação de valores mais elevados de TFGe naqueles portadores do genótipo TT ( $77 \pm 3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}/1.73\text{m}^2$ ) quando comparados com portadores dos genótipos CT ( $70 \pm 2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}/1.73\text{m}^2$ ) e CC ( $73 \pm 3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}/1.73\text{m}^2$ ; média  $\pm$  EPM;  $p=0,007$ ). Nenhuma relação entre TFGe e os genótipos foi observada no grupo das mulheres  $68 \pm 4$  (TT),  $65 \pm 2$  (CT) e  $68 \pm 3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}/1.73\text{m}^2$  (CC;  $p=0,75$ ) (análise de ANCOVA feita em modelo recessivo para o alelo raro T) (Figura 8a) (83).

### 4.2.2. Coorte brasileira

A distribuição dos genótipos de acordo com os estágios de ND para o SNP rs713041 no gene *GPX4* pode ser observada na Tabela 7. Nos pacientes do sexo

masculino, observou-se uma associação inversa entre a presença do alelo raro T e a presença de ND estabelecida/avançada (OR: 0,30; IC 95%: 0,13 – 0,68;  $p=0,004$ ) (Tabela 7 e Figura 8b). Nenhuma associação foi observada com qualquer estágio de ND nas pacientes do sexo feminino. Estes resultados estão de acordo com a prevalência da ND estabelecida/avançada em pacientes masculino portadores dos genótipos CC (43%) CT (28%) e TT (20%). Nenhuma associação com a TFGe, com relação ao *SNP* rs713041 no gene da *GPX4*, foi observada nos grupos de homens e mulheres. Os resultados observados foram:  $77 \pm 4$  (CC),  $81 \pm 3$  (CT) e  $83 \pm 5$  ml.min<sup>-1</sup>/1.73m<sup>2</sup> (TT; média  $\pm$  EPM,  $p=0,55$ ) nos homens, e  $79 \pm 4$  (CC),  $80 \pm 3$  (CT) e  $70 \pm 5$  ml.min<sup>-1</sup>/1.73m<sup>2</sup> (TT média  $\pm$  EPM;  $p=0,24$ ) nas mulheres (análise de ANCOVA feita em modelo recessivo para o alelo raro T) (83).

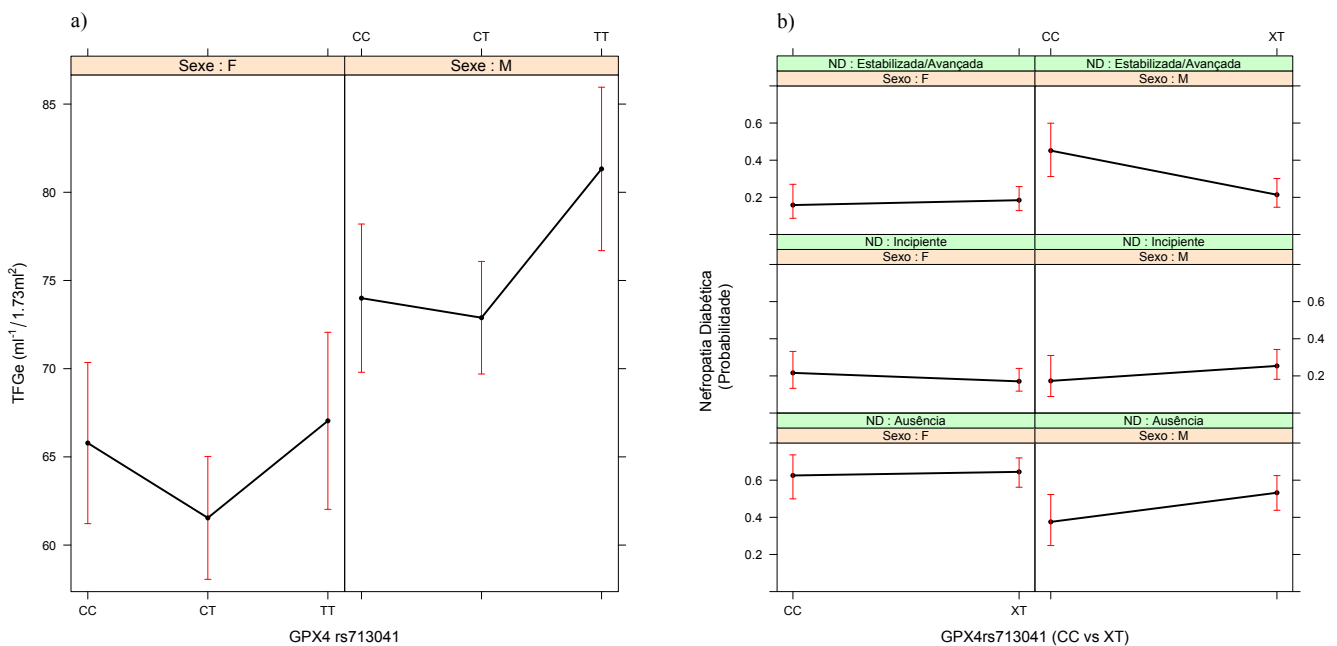


Figura 8 - (a) Taxa de Filtração Glomerular estimada (TFGe) nas coortes GENESIS/GENEDIAB determinada por análise de ANCOVA com base em um modelo recessivo para o alelo raro T do rs713041 no gene *GPX4*. (b) Probabilidade estimada de evolução dos estágios de nefropatia diabética na coorte brasileira determinada por análise de regressão logística nominal com base no *Odds Ratio* (OR) obtido em um modelo dominante para o alelo raro T do rs713041 no gene *GPX4*.

**Tabela 7 - Coorte brasileira: frequência genotípica do rs713041 no gene *GPX4* de acordo com os estágios de nefropatia diabética.**

	Ausência de nefropatia	Nefropatia incipiente	Nefropatia estabelecida/avançada	OR (IC 95%) para nefropatia incipiente	<i>p</i>	OR (IC 95%) para nefropatia estabelecida/avançada	<i>p</i>
Mulheres	(n=152)	(n=44)	(n=56)	0,78 (0,37 – 1,66)	0,51	1,25 (0,57 – 2,88)	0,58
CC	0,296	0,341	0,214				
CT	0,546	0,523	0,536				
TT	0,158	0,136	0,250				
Homens	(n=91)	(n=38)	(n=58)	1,04 (0,42 – 2,80)	0,92	<b>0,30 (0,13 – 0,68)</b>	<b>0,004</b>
CC	0,264	0,237	0,431				
CT	0,527	0,526	0,448				
TT	0,209	0,237	0,121				

OR (*odds ratio*) e Intervalo de Confiança (IC) 95% para o alelo raro em um modelo dominante de regressão logística ajustada para sexo, idade, tempo de DM, hipertensão arterial sistêmica, HbA1c, triglicérides e uso de hipolipemiantes.  $p \leq 0,025$  foi considerado significativo.

### 4.3. *CYBB*

Os resultados exibidos para o SNP neste gene geraram uma publicação no periódico *Free Radical Research* (ANEXO L). A associação da ND com o SNP rs6610650 no gene *CYBB* na coorte brasileira não foi analisada, pois a frequência dos genótipos não estava em EHW. Uma vez que variáveis biológicas contínuas estão menos sujeitas ao efeito do EHW, foi possível verificar a associação deste SNP apenas com a TFGe. Da mesma forma que o rs713041, não foi observada associação do rs6610650 com nenhum dos desfechos estudados quando a análise foi realizada com a população total. Entretanto, quando a população foi estratificada por sexo, este SNP mostrou-se associado com a doença renal diabética no sexo feminino, razão pela qual as análises nas coortes francesas e brasileiras foram feitas para ambos os sexos, como descrito no item 2.6 da metodologia.

Os dados obtidos na coorte SURGENE não são mostrados, pois nenhuma associação foi observada para este polimorfismo com a prevalência dos estágios da ND, nem com a incidência de eventos renais.

#### 4.3.1. Coorte *GENESIS/GENEDIAB*

Uma associação após estratificação por sexo foi observada nas coortes francesas com relação ao SNP rs6610650 no gene *CYBB*. A distribuição dos genótipos de acordo com os estágios da ND para esse SNP pode ser observada na Tabela 8. O alelo raro A deste polimorfismo mostrou-se associado com a ND estabelecida/avançada no sexo feminino (OR: 1,75; IC 95%: 1,11 – 2,78;  $p=0,016$ ), enquanto nenhuma associação foi observada no sexo masculino (Tabela 8 e Figura 9a). Estes resultados estão em concordância com a prevalência da ND estabelecida/avançada de acordo com a distribuição dos genótipos AA (47%), AG (46%) e GG (36%) nas mulheres. Nenhuma

associação foi observada em relação à TFGe e a distribuição dos genótipos para o rs6610650 no gene *CYBB*:  $72 \pm 7$  (AA),  $70 \pm 3$  (AG) e  $68 \pm 2$  ml.min<sup>-1</sup>/1,73m<sup>2</sup> (GG  $p=0,72$ ) no sexo feminino, e  $75 \pm 4$  (A) e  $75 \pm 2$  ml.min<sup>-1</sup>/1,73m<sup>2</sup> (G,  $p=0,97$ ) no sexo masculino (83).

#### 4.3.2. Coorte brasileira

Não foi observada nenhuma associação entre a TFGe e os alelos A e G na população masculina:  $77 \pm 5$  vs.  $81 \pm 3$  ml/min (média  $\pm$  EPM,  $p=0,43$ ), respectivamente. Entretanto na população feminina, foi possível observar uma TFGe menor entre as pacientes com genótipo AA ( $64 \pm 7$  ml.min<sup>-1</sup>/1,73m<sup>2</sup>) quando comparadas com as pacientes portadoras dos genótipos AG ( $78 \pm 4$  ml.min<sup>-1</sup>/1,73m<sup>2</sup>) e GG ( $79 \pm 3$  ml.min<sup>-1</sup>/1,73m<sup>2</sup>) ( $p=0,02$ ) em uma análise de ANCOVA feita em um modelo recessivo para o alelo raro A (Figura 9b) (83).

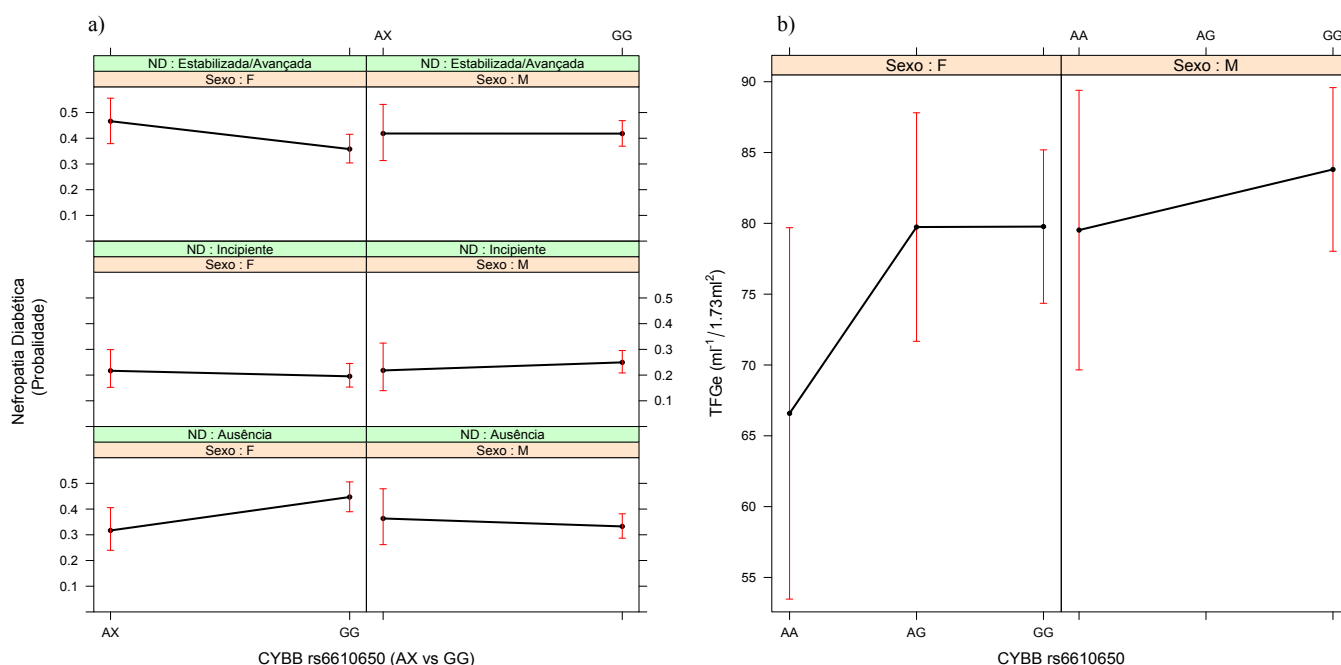


Figura 9 — (a) Probabilidade estimada de evolução dos estágios de nefropatia diabética nas coortes GENESIS/GENEDIAB, determinada por regressão logística nominal com base no *Odds Ratio* (OR) obtido em um modelo dominante para o alelo raro A do rs6610650 no gene *CYBB*. (b) Taxa de Filtração Glomerular estimada (TFGe) na coorte brasileira determinada por análise de ANCOVA com base em um modelo recessivo para o alelo raro A do rs6610650 no gene *CYBB*.

**Tabela 8 - Coortes francesas GENESIS/GENEDIAB: frequência genotípica do rs6610650 no gene *CYBB* e do rs713041 no gene *GPX4* de acordo com os estágios de nefropatia diabética.**

	Ausência de nefropatia	Nefropatia incipiente	Nefropatia estabelecida/avançada	OR (IC 95%) para nefropatia incipiente	<i>p</i>	OR (IC 95%) para Nefropatia estabelecida/avançada	<i>p</i>
<b>rs6610650 (<i>CYBB</i>)</b>							
Mulheres	(n=172)	(n=86)	(n=164)	1,49 (0,82 – 2,70)	0,19	<b>1,75 (1,11 – 2,78)</b>	<b>0,016</b>
GG	0,767	0,686	0,646				
AG	0,216	0,256	0,311				
AA	0,017	0,058	0,043				
Homens	(n=162)	(n=115)	(n=197)	0,90 (0,45 – 1,76)	0,76	1,03 (0,57 – 1,87)	0,92
G	0,846	0,852	0,833				
A	0,154	0,148	0,167				
<b>rs713041 (<i>GPX4</i>)</b>							
Mulheres	(n=170)	(n=84)	(n=161)	1,15 (0,76 – 1,73)	0,50	1,22 (0,82 – 1,80)	0,31
CC	0,288	0,262	0,255				
CT	0,477	0,524	0,497				
TT	0,235	0,214	0,248				
Homens	(n=160)	(n=114)	(n=197)	1,15 (0,79 – 1,67)	0,46	1,21 (0,84 – 1,74)	0,29
CC	0,310	0,289	0,235				
CT	0,462	0,465	0,536				
TT	0,228	0,246	0,229				

OR (*odds ratio*) e Intervalo de Confiança (IC) 95% para o alelo raro em um modelo codominante de regressão logística ajustada para sexo, idade, tempo de DM e coorte.  $p \leq 0,025$  foi considerado significativo.



#### 4.4. CAT

Os resultados exibidos para este SNP, geraram uma publicação no periódico *Diabetologia* (ANEXO M).

##### 4.4.1 Coorte SURGENE

O ANEXO A mostra os dados da frequência genotípica dos SNPs avaliados no gene *CAT* de acordo com os estágios de ND na fase basal; foi possível observar uma associação do alelo raro A do rs7947841 com a prevalência de ND incipiente (OR: 2,79; IC 95%: 1,21 – 6,24;  $p=0,01$ ) e com a prevalência de ND estabilizada/avançada (OR: 5,72; IC 95%: 1,62 – 22,03,  $p=0,007$ ) (Tabela 9). Estes resultados corroboram a prevalência de ND incipiente (GG: 8,3% vs. AA + AG: 15,4%) e ND estabilizada/avançada (GG: 5,4% vs. AA + AG: 10,8%) de acordo com os genótipos deste SNP. Uma associação do rs1001179 com a ND incipiente (OR:1,79; IC 95%: 1,17 – 2,79;  $p=0,008$ ) também foi observada para o alelo A deste SNP (74).

No ANEXO B pode-se observar as frequência genotípicas dos SNPs de acordo com a incidência de eventos renais. A incidência de eventos renais de acordo com o rs7947841 foi de 25% (GG) vs. 35,4% (AA + AG). Uma associação do alelo raro A do rs7947841 foi observada com a incidência de eventos renais por meio de regressão proporcional de risco de Cox (HR: 1,82; IC 95%: 1,13 – 2,81;  $p=0,01$ ) (Tabela 9). A Figura 10 mostra a curva de sobrevivência de Kaplan – Meier para pacientes portadores do genótipo GG vs. portadores do alelo A (AG + AA). Uma associação nominal deste SNP foi observada com a incidência de novos casos de microalbuminúria, quando considerados apenas pacientes que na fase basal eram normoalbuminúricos (HR: 1,88; IC 95%: 1,04 – 3,22;  $p=0,03$ ) (74).

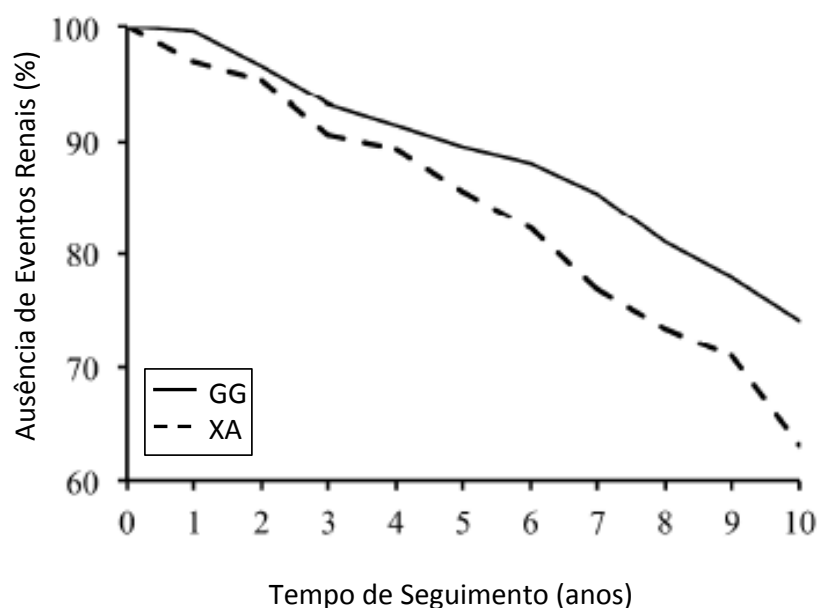


Figura 10 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Coorte SURGENE: Incidência de eventos renais em função do polimorfismo rs7947841 no gene *CAT*: GG (n=276), GA (n=61), AA (n=3).

#### 4.4.2 Coorte GENEDIAB

As frequências genótípicas de acordo com os estágios de ND para a coorte GENEDIAB na fase basal estão mostradas no ANEXO C; foi possível observar uma associação do alelo raro A do rs7947841 com a ND incipiente (OR: 3,13; IC 95%: 1,42 – 7,24;  $p=0,004$ ) e uma associação nominal ( $p>0,02$  e  $p<0,05$ ) com a ND estabilizada/avançada (OR: 2,14; IC 95%: 1,00 – 4,79;  $p=0,05$ ) (Tabela 9). A associação observada para a ND incipiente vai ao encontro da prevalência de ND incipiente de acordo com a distribuição dos genótipos para o rs7947841 (GG: 19,3% vs. GA + AA: 27,7%). Associações também foram encontradas para os SNPs rs10488736 e rs566979 ( $p=0,02$ ) (ANEXO C).

As frequências genótípicas dos SNPs no gene *CAT* de acordo com a incidência de IRCT na coorte GENEDIAB são mostradas no ANEXO B. Uma associação com a incidência de IRCT foi observada para o alelo raro A do rs7947841 (HR: 2,11; IC 95%: 1,23 – 3,60;  $p=0,008$ ) (Tabela 9) e para o alelo T do rs2420388 (OR: 2,80; IC 95%:

1,31 – 5,98;  $p=0,009$ ). Estes resultados estão em conformidade com a incidência de IRCT de acordo com a distribuição dos genótipos do rs7947841 (GG: 11,3% vs. GA + AA: 18,0%) e do rs2420388 (CC: 10,6% vs TC + TT: 16,2%). A Figura 11 mostra a curva de sobrevivência de Kaplan – Meier entre os pacientes portadores do genótipo GG vs. os portadores do alelo A (GA + AA) do SNP rs7947841.

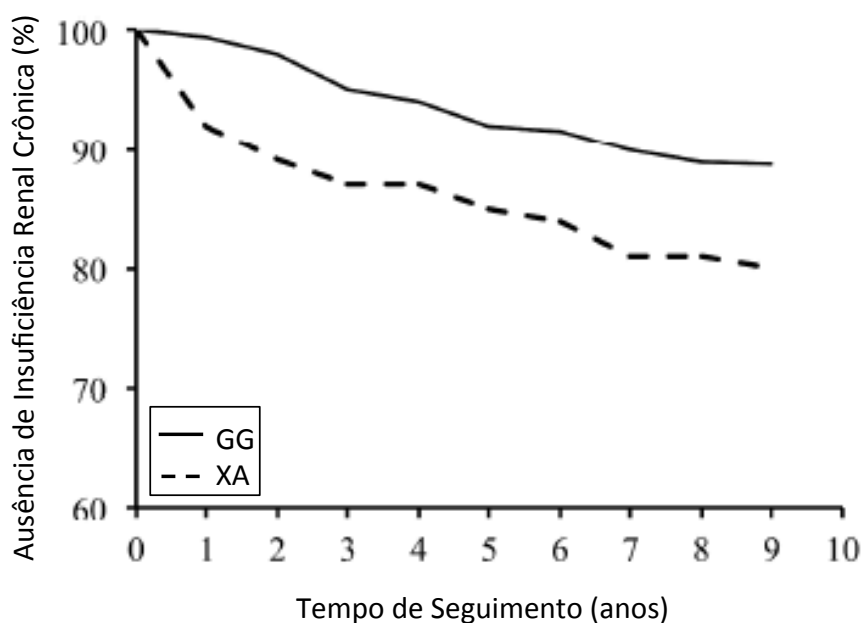


Figura 11 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Coorte GENEDIAB: Incidência de insuficiência renal crônica terminal em função do polimorfismo rs7947841 no gene *CAT*: GG (n=249), GA (n=63), AA (n=3).

#### 4.4.3 Coorte brasileira

O ANEXO D mostra a frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CAT* de acordo com os estágios de ND na coorte brasileira; foi possível observar uma prevalência maior de ND incipiente (GG: 16,0% vs. GA + AA: 22,2%) e ND estabilizada/avançada (GG: 26,7% vs. GA + AA: 28,6%) entre os portadores do alelo raro A do rs7947841. Esta associação foi confirmada para a ND estabilizada/avançada em modelo de regressão logística (OR: 2,71; IC 95%: 1,38 – 5,42;  $p=0,004$ ) bem como para a ND incipiente (OR: 2,16; IC 95%: 1,14 – 4,10;  $p=0,02$ ) (Tabela 9) (74).

**Tabela 9 - Resultados observados para o polimorfismo rs7947841 no gene *CAT* nas três coortes estudadas com relação a prevalência de nefropatia diabética (ND) incipiente ou estabilizada/avançada (expressos em *odds ratio* [OR] e intervalo de confiança [IC] de 95%) e a incidência de eventos renais ou insuficiência renal crônica terminal (IRCT) (expresso em *hazard ratio* [HR] e IC de 95%).**

rs7947841	Coorte SURGENE	p	Coorte GENEDIAB	p	Coorte brasileira	p
ND Incipiente	2,79 (1,21 – 6,24)	0,01	3,13 (1,42 – 7,24)	0,004	2,16 (1,14 – 4,10)	0,02
ND Estabilizada ou Avançada	5,72 (1,62 – 22,03)	0,007	2,14 (1,00 – 4,79)	0,05	2,71 (1,38 – 5,42)	0,004
Eventos Renais ou IRCT	1,82 (1,13 – 2,81)	0,01	2,11 (1,23 – 3,60)	0,008	-	-

#### 4.5. *CYBA*

As análises feitas para os SNPs no gene *CYBA* mostraram uma associação do rs9932581 com a prevalência de ND estabilizada/avançada nas coortes GENESIS/GENEDIAB e com a incidência de eventos renais ou doença renal terminal nas coortes SURGENE e GENESIS/GENEDIAB, respectivamente. Além disso este mesmo SNP esteve associado com a TFGe na coorte GENESIS/GENEDIAB.

##### 4.5.1. Coorte SURGENE

A frequência genotípica de acordo com os estágios de ND na fase basal é mostrada no ANEXO E. Não foi possível observar qualquer associação entre os SNPs genotipados no *CYBA* com a prevalência dos estágios de ND no começo do estudo. Associações nominais ( $p > 0,01$  a  $p < 0,05$ ) foram observadas para os seguintes SNPs: rs3794624 (ND incipiente); rs12709102 (ND estabilizada/avançada); rs1049255 (ND incipiente e ND estabilizada/avançada) e rs11076692 (ND estabilizada/avançada). Entretanto, estes resultados mostraram-se muito tênues, podendo retratar mais um erro tipo I que uma associação destes SNPs com os desfechos mencionados ou ainda um efeito devido ao grau de DL observado entre os SNPs (Figuras 12a e Figura 12b). Uma

associação inversa do alelo raro C do rs12709102 foi observada com a ND incipiente (OR: 0,20; IC 95%: 0,05 – 0,70;  $p=0,01$ ).

A frequência dos genótipos de acordo com a incidência de eventos renais é exibida no ANEXO F; foi possível observar uma maior incidência de eventos renais durante o seguimento do estudo com relação ao SNP rs9932581 entre os pacientes portadores do genótipo CC (33,3%) quando comparados aos pacientes portadores do alelo T (CT + TT 26,4%). Esta associação foi confirmada pela análise de regressão de risco de Cox em modelo codominante para o alelo raro T (HR: 0,63; IC 95%: 0,46 – 0,86;  $p=0,003$ ) (Tabela 10 e Figura 13). A Figura 14 mostra a curva de sobrevivência de Kaplan – Meier entre pacientes portadores do genótipo CC *vs.* portadores do alelo T (CT + TT). Não foi possível observar uma associação deste SNP com a incidência de novos casos de microalbuminúria quando considerados apenas pacientes que na fase basal eram normoalbuminúricos; entretanto foi possível observar uma tendência no mesmo sentido nesta análise, tendo, também, o alelo T raro como protetor (HR: 0,70; IC 95%: 0,47 – 1,00;  $p=0,06$ ).

A prevalência de ND ao fim do estudo foi de 40,0% (28,9%, 5,0% e 6,1%, para ND incipiente, estabilizada e avançada, respectivamente); foi possível observar uma associação do rs9932581 com a prevalência de ND estabilizada/avançada ao final do estudo, não observada com a prevalência de ND estabilizada/avançada na fase basal (OR: 0,42; IC 95%: 0,21 – 0,83;  $p=0,01$ ).

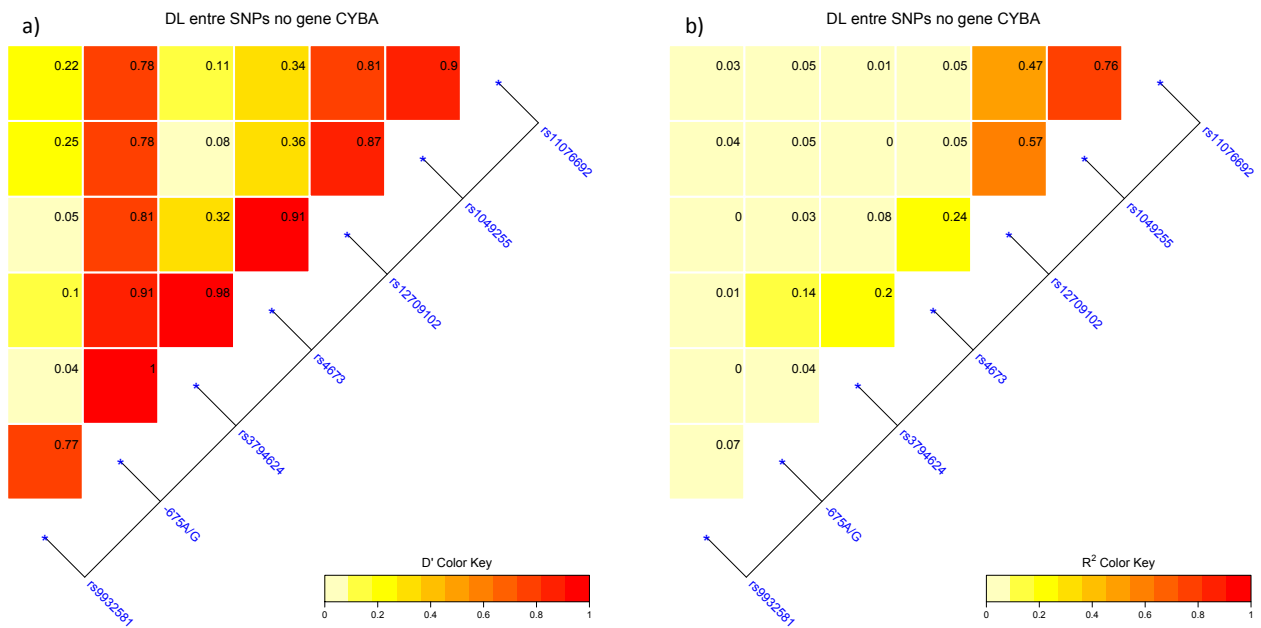


Figura 12 – Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos no gene *CYBA* na coorte SURGENE determinado por (a)  $D'$  e (b)  $r^2$ .

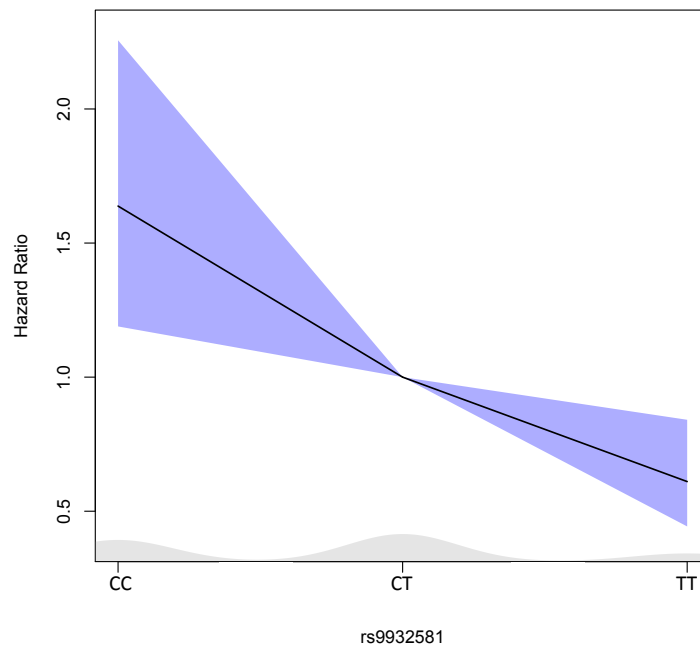


Figura 13 – Coorte SURGENE: HR (*hazards ratio*) e intervalo de confiança (IC) 95% para o alelo raro de rs9932581 no gene *CYBA* determinado em um modelo codominante de regressão de risco proporcional de Cox, ajustado por sexo, idade, tempo de DM, índice de massa corpórea, pressão arterial sistólica (PAS), média da PAS ao longo do tempo de estudo, uso de inibidor da enzima conversora da angiotensina na fase basal e ao final do estudo, tratamento para a hipertensão arterial e progressão da retinopatia diabética

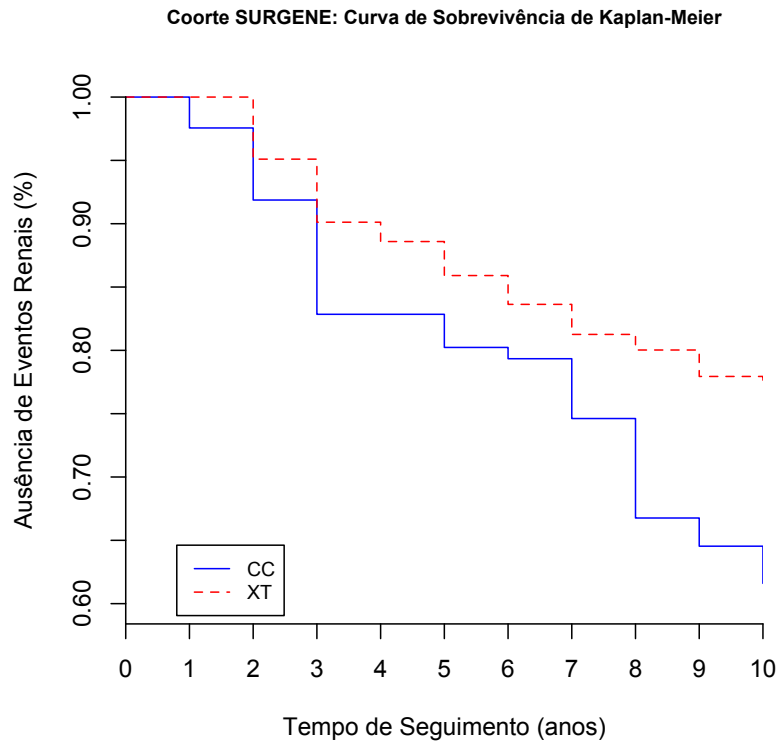


Figura 14 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier, coorte SURGENE: incidência de eventos renais em função do polimorfismo rs9932581 no gene *CYBA*: CC (n=119), CT (n=151), TT (n=51).

#### 4.5.2 Coorte GENESIS/GENEDIAB

A Figura 15a e a Figura 15b mostram os valores do DL existente entre os SNPs na coorte GENESIS/GENEDIAB. As frequências genotípicas de acordo com os estágios de ND estão ilustradas no ANEXO G; foi possível observar uma associação inversa do alelo raro T do rs9932581 com a ND estabilizada/avançada (OR: 0,60; IC 95%: 0,46 – 0,78;  $p=0,0001$ ) (Tabela 10). Estes resultados corroboram a prevalência de ND estabilizada/avançada de acordo com a distribuição genotípica (CC: 41,0% vs. CT + TT: 34,3%). Uma associação com a TFGe também foi observada para este SNP em um modelo recessivo para o alelo raro T na análise de ANCOVA:  $81 \pm 5$  (CC),  $84 \pm 5$  (CT),  $90 \pm 6$  ml.min<sup>-1</sup>/1,73m<sup>2</sup> (TT; média  $\pm$  EPM;  $p=0,003$ ). Uma associação inversa com a retinopatia diabética foi observada para o alelo raro C do rs12709102 (OR: 0,75; IC

95%: 0,60 – 0,93;  $p=0,01$ ), ajustado para as mesmas variáveis utilizadas na análise de ND.

A frequência dos genótipos de acordo com a incidência de IRCT é exibida no ANEXO F; foi possível observar uma maior incidência de IRCT durante o seguimento do estudo com relação ao SNP rs9932581 entre os pacientes portadores do genótipo CC (10,9%) quando comparados com pacientes portadores do alelo T (CT + TT, 5,2%). Esta associação foi confirmada pela análise de regressão de risco de Cox em modelo codominante para o alelo raro T (HR: 0,51; IC 95%: 0,31 – 0,78;  $p=0,002$ ) (Tabela 10 e Figura 16). A Figura 17 mostra a curva de sobrevivência de Kaplan – Meier entre pacientes portadores do genótipo CC vs. portadores do alelo T (CT + TT).

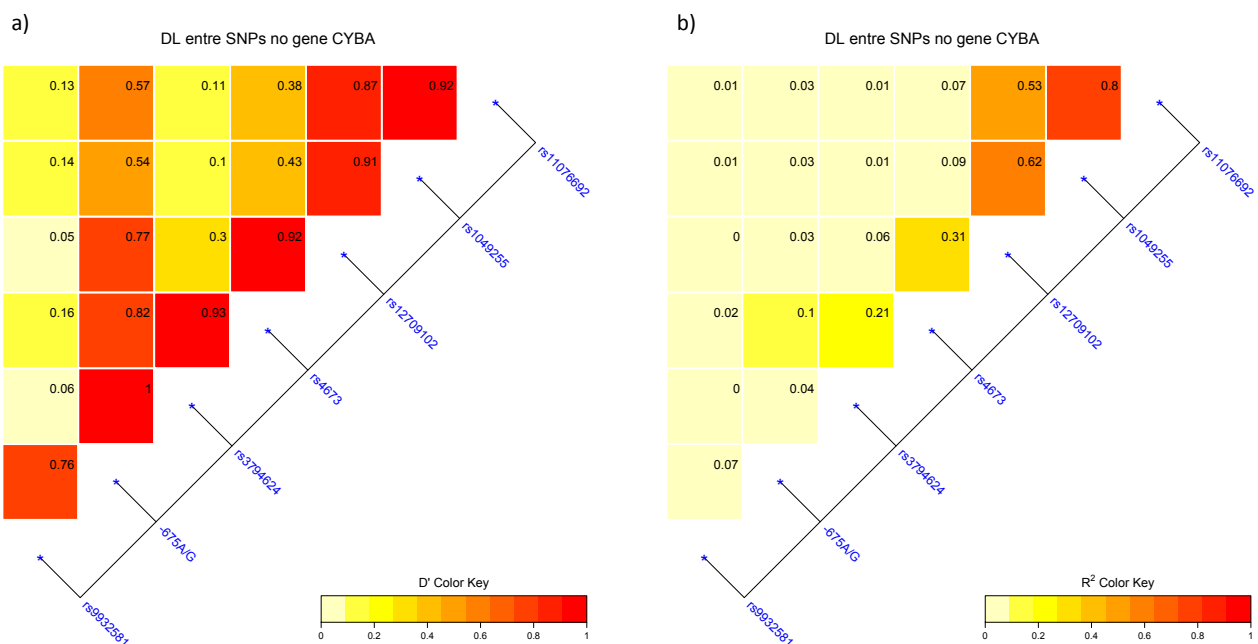


Figura 15 - Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos no gene *CYBA* nas coortes GENESIS/GENEDIAB determinado por (a)  $D'$  e (b)  $r^2$ .



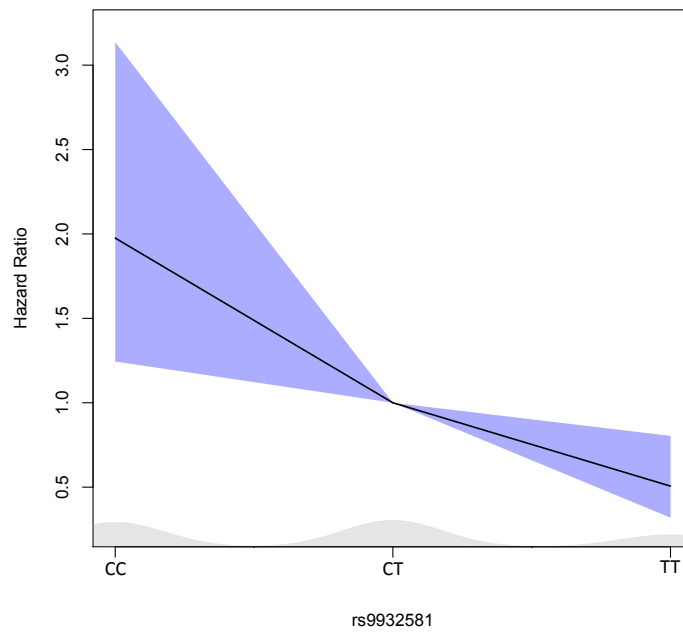


Figura 16 – Coorte GENESIS/GENEDIAB: HR (*hazards ratio*) e intervalo de confiança (IC) 95% para o alelo raro do rs9932581 no gene *CYBA* determinado em um modelo codominante de regressão de risco proporcional de Cox, ajustado por coorte, sexo, idade, tempo de DM, índice de massa corpórea, uso de inibidor da enzima conversora da angiotensina e bloqueador do receptor de angiotensina, HbA1c e retinopatia diabética.

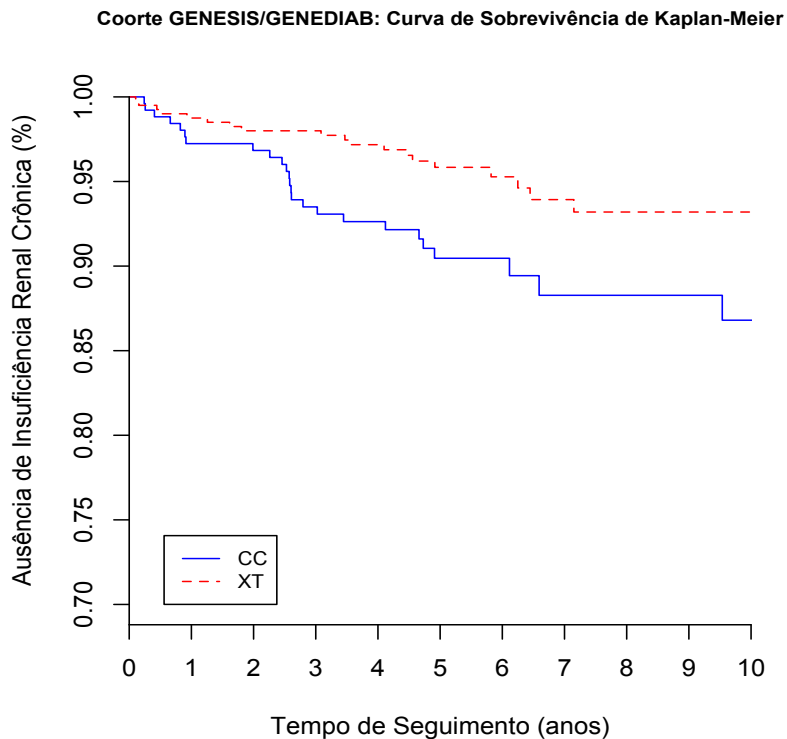


Figura 17 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Coorte GENESIS/GENEDIAB: Incidência de insuficiência renal crônica terminal em função do polimorfismo rs9932581 no gene *CYBA*: CC (n=256), CT (n=277), TT (n=125).

#### 4.5.3 Coorte brasileira

O ANEXO H mostra os dados da frequência genotípica de acordo com os estágios de ND; não foi possível observar associação do rs9932581 com nenhum estágios de ND nem com a TFGe.

**Tabela 10 - Resultados observados para o polimorfismos rs9932581 no gene *CYBA* nas três coortes estudadas com relação a prevalência de nefropatia diabética (ND) incipiente ou estabilizada/avançada (expressos em *odds ratio* [OR] e intervalo de confiança [IC] de 95%) e a incidência de eventos renais ou insuficiência renal crônica terminal (IRCT) (expresso em *hazard ratio* [HR] e IC de 95%).**

rs9932581	Coorte SURGENE	p	Coorte GENESIS/ GENEDIAB	p	Coorte Brasileira	p
ND Incipiente	0,71 (0,22 – 2,20)	0,56	0,80 (0,61 – 1,05)	0,11	0,92 (0,61 – 1,38)	0,69
ND Estabilizada ou Avançada	0,25 (0,04 – 1,34)	0,12	0,60 (0,46 – 0,78)	0,0001	1,31 (0,90 – 1,90)	0,16
Eventos Renais ou IRCT	0,63 (0,46 – 0,86)	0,003	0,51 (0,31 – 0,78)	0,002	-	-

#### 4.6. *SLC2A2*

##### 4.6.1. Coorte SURGENE

As frequências genotípicas dos SNPs de acordo com os estágios de ND na fase basal, estão mostradas no ANEXO I; foi possível observar uma associação dos SNPs rs11720145 (OR: 3,25; IC 95%: 1,33 – 7,98;  $p=0,01$ ), rs5400 (OR: 2,60; IC 95%: 1,07 – 6,27;  $p=0,03$ ) e rs11920090 (OR: 2,77; IC 95%: 1,14 – 6,70;  $p=0,02$ ) com a ND incipiente em um modelo de regressão logística dominante para os alelos raros A, T e T respectivamente. Estes resultados estão de acordo com a prevalência de ND incipiente de acordo com a distribuição dos genótipos (GG: 6,10% vs. XA: 17,50%; CC: 7,20% vs. XT: 16,88%; TX: 17,3% vs. AA: 7,10%; para os SNPs rs11720145, rs5400 e 11920090, respectivamente). Como podemos observar na Figura 18a e Figura 18b, existe um alto grau de DL entre os SNPs presente no gene *SLC2A2*, especialmente entre os SNPs rs11720145, rs5400 e 11920090 e entre os SNPs rs11924032 e rs5398. Tal fato ajuda a explicar o motivo de termos observados uma associação para os três SNPs com valores muito semelhantes.

A distribuição genotípica de acordo com a incidência de eventos renais é mostrada no ANEXO J. Não foi possível observar nenhuma associação de qualquer SNP com a incidência de eventos renais na coorte SURGENE. Em contrapartida, o rs11924032 foi associado com a diminuição da TFGe ao longo do estudo. Pacientes com genótipo GG perdem aproximadamente 2,18% da TFGe a cada ano, enquanto que pacientes com genótipo XT perdem cerca de 0,02% da TFGe a cada ano ( $p=0,005$ ). Esta associação também é observada quando a perda da TFGe é analisada em  $\text{ml.min/ano}^{-1}$  (GG:  $-2,24 \pm 0,53$  vs. XT:  $-0,56 \pm 0,50$ ;  $\text{ml.min/ano}^{-1} \pm \text{EPM}$ ;  $p=0,02$ ) (Figura 19a e Figura 19b).

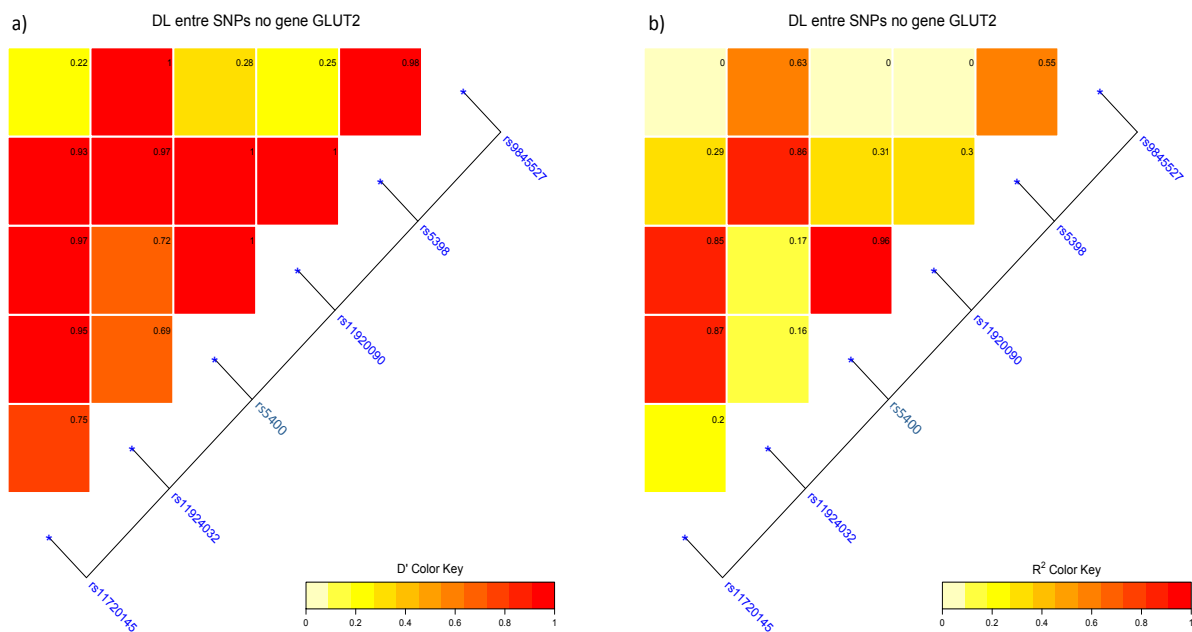


Figura 18 - Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos no gene *SLC2A2* na coorte SURGENE determinado por D' (a) e  $r^2$  (b).

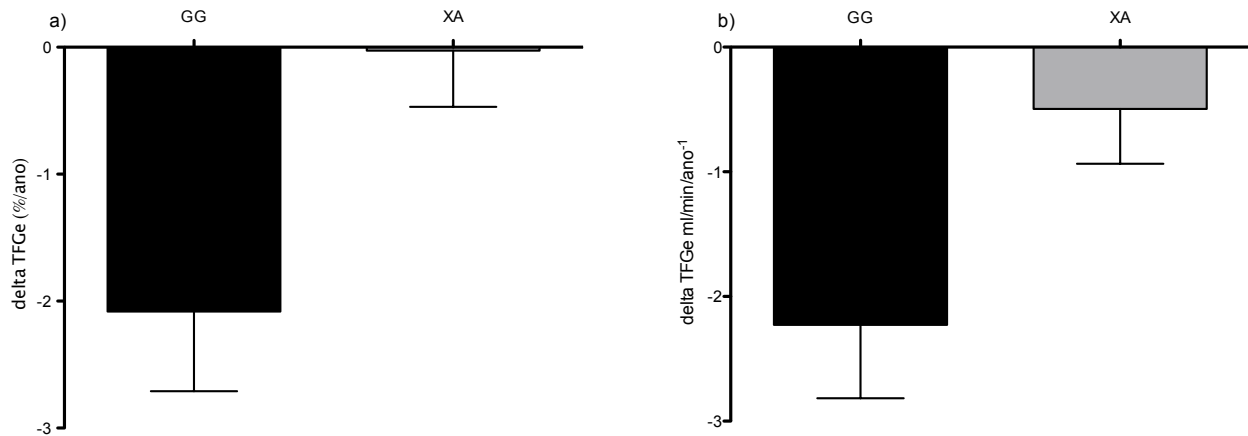


Figura 19 - Variação da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) durante o tempo de seguimento em (a) %/ano e (b) ml/min/ano<sup>-1</sup> na coorte SURGENE de acordo com os genótipos do polimorfismo rs11924032 no gene *SLC2A2*: GG (n=136), XA (n=147). Resultados expressos em média ± EPM.

#### 4.6.2. Coorte GENESIS/GENEDIAB

As frequências genóticas dos SNPs de acordo com os estágios de ND na fase basal estão mostradas no ANEXO K; foi possível observar uma associação do SNP rs5400 (OR: 1,68; IC 95%: 1,08 – 2,61;  $p=0,02$ ) com a ND incipiente em um modelo de regressão logística dominante para o alelo raro T. Este resultado está em concordância com a prevalência de ND incipiente de acordo com a distribuição dos genótipos (CC: 19,20% vs XT: 25,10%). Apenas associações nominais ( $p > 0,03$  e  $p < 0,05$ ) foram observadas para os SNPs rs11720145 (OR: 1,60; IC 95%: 1,03 – 2,49;  $p=0,04$ ) e 11920090 (OR: 1,60; IC 95%: 1,03 – 2,48;  $p=0,04$ ). A Figura 20 mostra o DL entre os SNPs genotipados nas coortes GENESIS/GENEDIAB. Assim como na coorte SURGENE, é possível observar um alto grau de DL entre os mesmos SNPs.

As frequências genóticas dos SNPs de acordo com a incidência de insuficiência renal crônica estão mostradas no ANEXO J; foi possível observar uma maior incidência de IRCT durante o seguimento do estudo com relação ao SNP rs11924032 entre os pacientes portadores do genótipo GG (9,3%) quando comparados com pacientes portadores do alelo A (GA + AA, 4,8%). Esta associação foi confirmada pela análise de regressão de risco proporcional de Cox em modelo codominante para o

alelo raro A (HR: 0,53; IC 95%: 0,29 – 0,89;  $p=0,01$ ) (Figura 21). A Figura 22 mostra a curva de sobrevivência de Kaplan – Meier entre pacientes portadores do genótipo GG vs. portadores do alelo A (GA + AA).

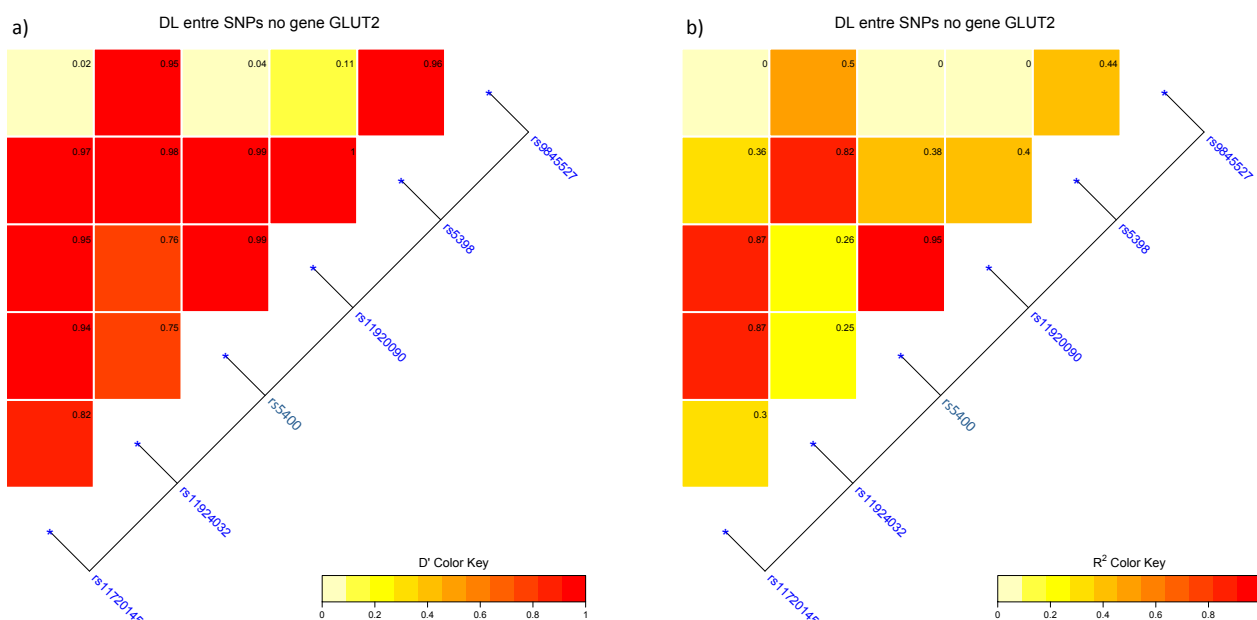


Figura 20 Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos no gene *SLC2A2* nas coortes GENESIS/GENEDIAB determinado por D' (a) e r² (b).

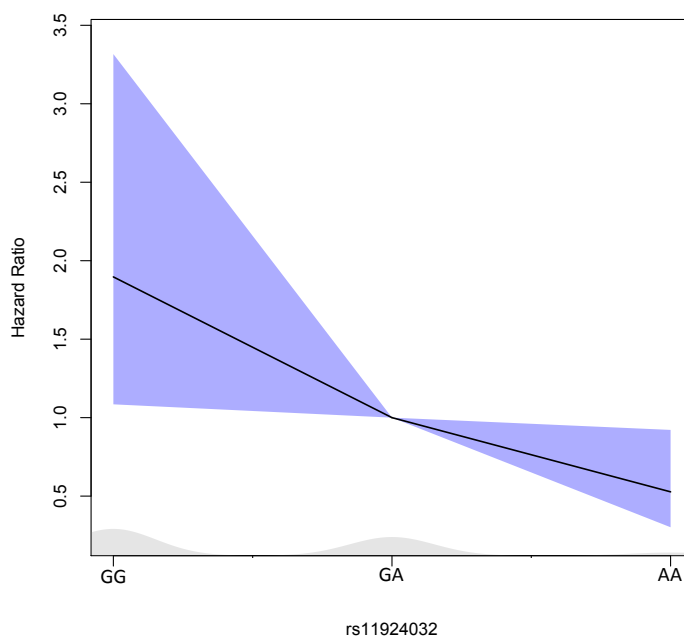


Figura 21 – Coorte GENESIS/GENEDIAB: HR (*hazards ratio*) e IC 95% para o alelo raro do rs11924032 no gene *SLC2A2* determinado em um modelo codominante de regressão de risco proporcional de Cox, ajustado por coorte, sexo, idade, tempo de DM, pressão arterial sistólica (PAS), HbA1c e retinopatia diabética.

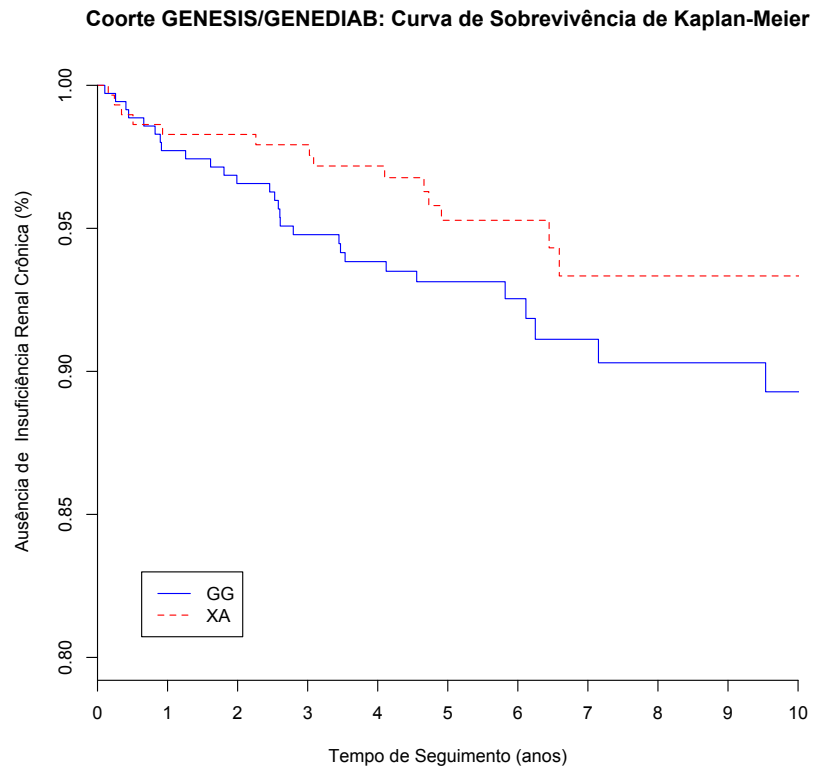


Figura 22 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Coorte GENESIS/GENEDIAB: Incidência de insuficiência renal crônica em função do polimorfismo rs11904032 no gene *SLC2A2*: GG (n=354), GA (n=240), AA (n=42).

## 5. Discussão

No presente estudo foi possível observar a associação de SNPs localizados em genes pertencentes a vias anti e pró-oxidantes em quatro coortes diferentes com *background* étnicos distintos. Os polimorfismos rs713041 no gene *GPX4* e rs6610650 no gene *CYBB* mostraram associações com o sexo masculino e feminino, respectivamente. O alelo raro T do rs713041 foi associado inversamente com a prevalência de ND estabilizada/avançada na coorte brasileira e também foi associado com valores elevados de TFGe nas coortes francesas. Com relação ao rs6610650 no gene *CYBB*, o alelo raro A deste polimorfismo mostrou-se associado com valores baixos de TFGe na coorte brasileira e com a prevalência de ND estabilizada/avançada nas coortes francesas.

Embora com desfechos distintos, os alelos raros dos polimorfismos nos genes *GPX4* e *CYBB* mostraram associações com o mesmo sexo tanto na coorte brasileira, quanto nas coortes francesas. As diferenças fenotípicas observadas para esses SNPs nas duas populações poderiam ser explicada por: (1) diferentes graus de DL entre estes polimorfismos e outras variantes funcionais presente nos genes *CYBB* e *GPX4*; (2) diferenças nos critérios de inclusão entre as coortes francesas e brasileiras e (3), um erro tipo 1 (resultados falso-positivo). Como os números de homens e mulheres são parecidos entre as coortes e o poder estatístico foi similar entre os grupos, parece mais apropriado afirmar que os efeitos observados refletem mais uma base biológica do que puramente uma base estatística (84).

O gene *CYBB* está localizado no cromossomo X e associações influenciadas pelo sexo com doenças complexas, como hipertensão arterial, já foram descritas para outros *loci* neste cromossomo (85). Em relação ao gene *GPX4*, mulheres têm uma expressão maior dessa enzima do que homens, e especificamente para o SNP rs713041, diferenças relacionados aos genótipos na expressão, atividade e interação com outras

selenoproteínas em linfócitos de pacientes saudáveis já foram descritas como sendo moduladas pelo sexo (46).

O genótipo CC do rs713041 no gene *GPX4* mostrou-se associado com acidente vascular cerebral em indivíduos com hipertensão arterial essencial (86) e com maior frequência de câncer colorretal (44), duas condições para as quais há evidências de que o aumento do estresse oxidativo está implicado na patogênese (87-89). Os achados de um efeito protetor do alelo T contra disfunção renal em indivíduos com DM1 são consistentes com estes resultados. A GPX-4 é uma selenoproteína que contém selênio sob a forma do 21º aminoácido, selenocisteína. A incorporação da selenocisteína ocorre durante a tradução e requer a presença de um RNA mensageiro (RNAm) de estrutura em alça pedunculada e de uma sequência de inserção selenocisteína (SECIS), localizada na extremidade 3' não traduzida (3'UTR) do RNAm da selenoproteína (90). O SNP rs713041 no gene *GPX4* está localizado perto da região predita da SECIS e há evidências experimentais sugerindo que essa variante tem um impacto funcional direto sobre a incorporação da selenocisteína, síntese e expressão de GPX-4, interação com outras selenoproteínas e resposta a um desafio oxidativo (43-46).

As selenoproteínas competem pelo selênio disponível e, quando o fornecimento de selênio está limitado, a síntese de algumas destas proteínas é mantida em detrimento da síntese de outras (91, 92). Esta prioridade depende de diferenças na capacidade das sequências do RNAm na região 3' UTR em interagir com a maquinaria da incorporação da selenocisteína (44, 45, 91). O SNP rs713041 influencia a posição relativa da GPX-4 na hierarquia de síntese de selenoproteína, e um mecanismo com base nessa hierarquia de síntese de selenoproteína foi proposto como explicação para os efeitos deletérios do alelo C do rs713041. O alelo C é associado a uma maior expressão de GPX-4 (46), e o aumento da síntese de GPX-4 leva à diminuição da síntese de outras selenoproteínas,



tais como GPX-1, com um resultado final de aumento do estresse oxidativo (44, 86). Por outro lado, o alelo C está associado com um aumento na produção de produtos de lipoxigenase, que podem contribuir para uma resposta inflamatória anormal dos tecidos (86).

Estudos com roedores mostraram que tanto a GPX-1 como a GPX-4 são altamente expressas nos rins (93), com a GPX-1 representando 96% da atividade renal de GPX (94). Uma proporção de expressão de 9:1 de GPX-1:GPX-4 foi observada em linfócitos humanos (46). O mecanismo de hierarquia entre as selenoproteína ocorre também no rim e em condições de deficiência de selênio, a síntese de GPX-4 é protegida às custas da síntese de GPX-1 (90). A deficiência de selênio têm sido relatada em pacientes com DM1 (95), e a atividade total de GPX está reduzida nos rins de roedores em modelos de DM (96, 97).

Mutações no gene *CYBB* causam doença granulomatosa crônica, uma imunodeficiência primária no qual não há dados mensuráveis de *burst* respiratório (98). Um microssatélite altamente polimórfico, de dinucleotídeo TA de aproximadamente 550 pb a montante do promotor parece modular a atividade do promotor do *CYBB*, além de estar associado com a susceptibilidade à malária grave (99). O alelo A do SNP rs6610650 no gene *CYBB*, associado com um maior risco de ND e com menor TFGe neste estudo, mostrou-se em DL com o alelo de 15 repetições ([TA]15) (100). Este alelo mostrou-se associado com uma maior atividade da NADPH e produção de EROS em neutrófilos (99). O papel das EROS geradas pela NADPH na ND é suportado por um grande número de dados na literatura (80, 101-103). Isto inclui aumento da expressão de NOX-2 (codificada pelo gene *CYBB*) (101) e da subunidade reguladora *p22<sup>phox</sup>* (gene *CYBA*) (102) no rim de ratos com ND, bem como as associações de variantes no gene *CYBA* com ND em pacientes com DM1 (80, 103).

Os resultados heterogêneos observados com os genes *CYBB* e *GPX4* nas populações estudadas sugerem que esses genes não estejam entre os principais determinantes da ND, mas que possivelmente modulam de maneira sexo-específica o risco de doença renal em portadores de DM1.

A análise referente ao gene *CAT* revelou uma associação do alelo raro A do rs7947841 com a prevalência de ND incipiente e estabilizada/avançada nos pacientes de descendência europeia das coortes SURGENE e GENEDIAB, bem como na coorte brasileira, que apresenta um *background* genético distinto, caracterizado por importante miscigenação. Esse mesmo alelo foi associado com a incidência de eventos renais e de IRCT nas coortes SURGENE e GENESIS/GENEDIAB, respectivamente.

A catalase é uma proteína antioxidante e sua atividade parece estar aumentada em situações de estresse oxidativo (104). Em pacientes com ND, a atividade da catalase também já foi encontrada como sendo aumentada (105, 106), o que poderia sugerir um mecanismo adaptativo em resposta ao estresse oxidativo.

O estudo realizado em colaboração com o professor Gilberto Velho, no qual se realizou a genotipagem de alguns SNPs no gene *CAT* na coorte brasileira, também avaliou a atividade da catalase em um segmento de pacientes das coortes SURGENE (n=120) e GENEDIAB (n=391). As amostras de plasma coletadas em EDTA na fase basal foram conservadas em *freezer* -80°C e a atividade avaliada com o uso de um estojo comercial (74). A atividade da enzima catalase foi aumentada entre os pacientes que possuíam ND quando comparada com aqueles que não possuíam. Quando a análise levou em consideração o genótipo dos pacientes com relação ao SNP rs7947841, foi possível observar que entre os pacientes com ND, a atividade da catalase era diminuída entre os pacientes portadores do genótipo GA + AA, enquanto que esta diferença não foi observada entre os pacientes que não possuem ND (74). O rs7947841 está localizado

no íntron 11 do gene *CAT*, longe do sítio de *splicing*; nunca foram realizados estudos funcionais com esse SNP, de forma que as razões pelas quais ele pode modular a susceptibilidade a ND não são conhecidas.

Não foi possível observar associação do gene *CAT* com a função renal ou com doença renal crônica em pacientes com DM1 em recentes estudos genômicos de associação global (*Genome Wide Association Study, GWAS*) (107, 108). Entretanto, um estudo de base familiar, que testou 115 genes candidatos em 72 famílias de pacientes diabéticos tipo 1 de descendência europeia observou uma associação de dois SNPs no gene *CAT*, rs1049982 (região 5'UTR) e rs560807 (intrônico) com ND definida como IRCT ou ACR >300 µg/mg. É interessante observar que a variante rs560807 está em completo DL com o rs7947841, enfatizando os resultados observados com relação a associação deste SNP e a prevalência e incidência de ND nas coortes europeias e brasileira.

O alelo raro T do SNP rs9932581, localizado na região promotora do gene *CYBA*, mostrou-se inversamente associado com a ND estabilizada/avançada e associado com valores mais elevados de TFG<sub>e</sub> na coorte GENESIS/GENEDIAB. Esta associação também ocorreu com a incidência de eventos renais e de IRCT nas coortes SURGENE e GENESIS/GENEDIAB, respectivamente. A associação deste SNP com a prevalência de qualquer estágio de ND não foi observada na coorte brasileira.

O gene *CYBA* codifica a subunidade  $p22^{phox}$  da NADPH oxidase e diversos SNPs já foram estudados neste gene (109-111). O rs4673 é o SNP mais estudado no gene *CYBA*, muito pelo fato de estar presente em uma região exônica, codificando a troca de uma histidina por uma tirosina na posição 72 (H72T). Embora uma associação do rs4673 já tenha sido observada com a ND em pacientes com DM1 (103), nenhuma associação foi observada para este SNP no presente estudo. Os resultados com relação a

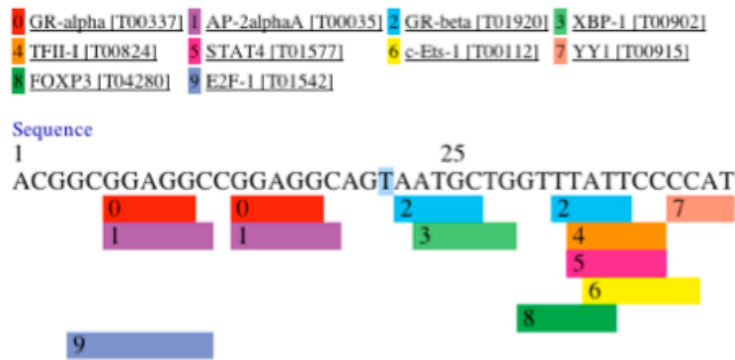
associação deste SNP ainda são controversos e uma maior atividade da NADPH oxidase já foi associada com ambos os alelos (112, 113). Da mesma forma, ambos os alelos já foram associados com alguma condição patológica. O alelo T já foi associado com hipertensão arterial (114), doença cerebral isquêmica (115), ND em pacientes com DM1 (103) e DM2 (116), periodontite (117), doença arterial coronariana (118, 119) e evolução para eventos renais (120). Em contrapartida o alelo C também mostrou-se associado com hipertensão arterial (121), resistência à insulina (122), aterosclerose em pacientes com DM2 (123, 124), aumento na produção de EROs (125), doença arterial coronariana (126-128), e Síndrome metabólica (129). Além disso, outros trabalhos não conseguiram mostrar qualquer associação do rs4673 com as doenças avaliadas (130-132).

O SNP -675 T/A mostrou-se associado à hipertensão arterial e estudos funcionais demonstraram que o alelo ancestral T possui uma maior ligação ao fator de transcrição HIF-1 $\alpha$ , aumento da expressão do RNAm e conseqüentemente maior produção da proteína e da geração de EROs. Pacientes com genótipo TT demonstraram maior produção de radical superóxido por seus leucócitos do que pacientes portadores do genótipo TA ou AA (79). O alelo raro A deste SNP foi associado com doença renal crônica na mesma coorte de pacientes brasileiros utilizados neste estudo (80). Embora nas coortes europeias nenhuma associação tenha sido observada com esse SNP, uma tendência foi observada com relação a TFGe na coorte SURGENE:  $95 \pm 1$  (TT),  $101 \pm 3$  (TA),  $108 \pm 13$  ml.min<sup>-1</sup>/1.73m<sup>2</sup> (AA; média  $\pm$  EPM;  $p=0.06$ ). Vale ressaltar que a tendência observada, tem o mesmo sentido observado na coorte brasileira, com o alelo A sendo protetor.

O SNP rs9932581 no gene *CYBA* foi descrito primeiramente em 2003 por Moreno et al. e está localizado na região promotora do gene, na posição -930. Neste

mesmo trabalho foi demonstrado que o alelo C apresenta uma maior atividade transcricional em pacientes com hipertensão arterial, bem como uma associação com este desfecho (111). Uma análise na região promotora do gene *CYBA* mostrou que este SNP encontra-se em um possível local de interação com o fator de transcrição *CCAAT-Enhancer Binding Protein (C/EBP $\delta$ )* e maior atividade maior do alelo C, quando comparada com o alelo T, foi observada quando vetores e o fator de transcrição *C/EBP $\delta$*  foram co-transfectados em células aórticas de ratos (133). Uma análise preditiva utilizando o *site* ALGEN-PROMO ([http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo\\_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF\\_8.3](http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3)), que avalia possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição, revelou que a substituição do alelo T pelo alelo C criaria um sítio de ligação para o fator de transcrição *C/EBP $\alpha$*  e *C/EBP $\beta$*  (Figura 23). A partir de então, muitos trabalhos de associação genética foram publicados com foco neste SNP, mas poucos com a ND (134) e nenhum deles com ND em pacientes com DM1. Já foram demonstradas associações com hipertensão arterial (111, 133, 135-137), resistência à insulina (138), fumo e estreitamento da camada íntima-média da carótida (139), estresse oxidativo e doença pulmonar obstrutiva crônica (140), doença coronal arteriana (141) e edema pulmonar provocado por altitudes elevadas (142). Assim como nas coortes francesas, todas as associações encontradas na literatura demonstraram um efeito protetor do alelo T do rs9932581 presente na região promotora do gene *CYBA*.

a)  
Factors predicted within a dissimilarity margin less or equal than 15 % :



b)  
Factors predicted within a dissimilarity margin less or equal than 15 % :

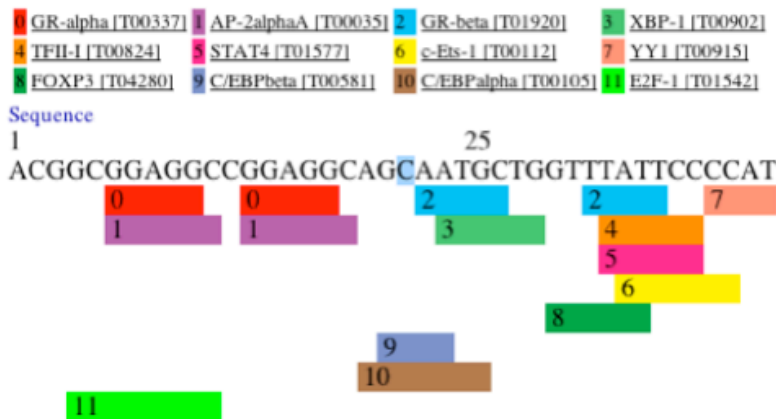


Figura 22 – Modelo de predição discriminando os possíveis fatores de transcrição que interagem na presença do alelo (a) T ou (b) C do polimorfismo XXXX no gene *CYBA*.

A proteína codificada pelo gene *CYBA*, a  $p22^{phox}$ , forma um complexo heterodimérico estável com a proteína  $gp91^{phox}$ , codificada pelo gene *CYBB*. Este heterodímero é denominado flavocitocromo  $b_{558}$  e contém toda a maquinaria necessária para o transporte de elétrons pela NADPH oxidase, utilizado para a produção de EROs (143). A estabilização deste complexo é tão importante que já foi demonstrado que pacientes com doença granulomatosa crônica por mutação no gene que codifica a  $gp91^{phox}$  não possuem quantidade detectáveis de  $p22^{phox}$  em seus fagócitos e vice-versa (144, 145).

A expressão de NADPH oxidase nos rins é bem estabelecida e a proteína  $p22^{phox}$  é necessária em quase todos os subtipos de NADPH oxidase, exceção feita àquelas que possuem NOX-5, que não necessitam da estabilização dada pela  $p22^{phox}$  (53). As proteínas NOX-2 e, em maior quantidade, NOX-4 são as principais fontes de EROs nos rins (146) e o envolvimento destas proteínas nos mecanismos de desenvolvimento da ND têm sido proposto (147, 148). Recentemente foi demonstrado que o tratamento com um siRNA, direcionado ao RNAm da NOX-4, e plumbalgina, um inibidor de NOX-4, melhorou a ND em modelo de DM em camundongo (149). A administração de bilirrubina, conhecida por suas propriedades antioxidantes, proporcionou efeitos benéficos em um modelo de nefropatia induzida por ciclosporina, levando à redução da expressão de  $p22^{phox}$  e NOX-4 em células renais de ratos, bem como à diminuição da produção de EROs em células HK-2, que são células humanas provenientes do epitélio tubular renal proximal (150).

A interação entre  $p22^{phox}$  e as proteínas NOX é importante para manter a estabilização das subunidades e elas são requeridas em uma proporção 1:1 (151). Desta forma, parece plausível supor que uma baixa expressão de  $p22^{phox}$  levaria a uma perda nesta proporção e, conseqüentemente, uma menor produção de EROs pela NADPH oxidase. O SNP rs9932581 no gene *CYBA* já foi descrito como funcional com o alelo T sendo responsável por uma menor expressão desta proteína (111). Para a proteína NOX-4, maior fonte de EROs no rim, existe um consenso de que as outras subunidades necessárias para a completa ativação de NOX-2 ( $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  e Rac2 ou seus homólogos) não são necessárias para a ativação e produção de EROs (152). Entretanto, recentemente, uma proteína envolvida na divisão celular denominada Poldip2 (do inglês *polymerase DNA-directed delta interacting protein 2*), foi capaz de aumentar a atividade de NOX-4 em três vezes através da interação com  $p22^{phox}$  (153). Outra

proteína, substrato de tirosina cinase com cinco domínios SH3 (Tks5, do inglês *tyrosine kinase substrate with 5 SH3 domains*) também mostrou a capacidade de aumentar a produção de NOX-4 através da interação com  $p22^{phox}$  (154). Todavia, a interação destas proteínas com a atividade de NOX-4 ainda não é completamente clara e Gianni et al. demonstraram que a co-transfecção de NOX-4 e Tks5 não aumenta a produção de EROs em células 293T (155). Se  $p22^{phox}$  é ou não a única proteína necessária para a completa ativação de NOX-4, ainda não se sabe, porém a interação com as outras proteínas, como Poldip2 e Tks, ocorre de fato com  $p22^{phox}$ , reforçando a importância desta subunidade no complexo mecanismo de funcionamento da NADPH oxidase.

Entre os SNPs mais estudados na literatura, referente ao gene *SLC2A2* está o rs5400 (Thr110Ile), presente no éxon 3 e que codifica a troca de uma treonina por uma isoleucina. A presença da isoleucina (alelo raro T) mostrou-se associada com cárie (156), aumento da absorção de açúcar (157) e DM2 (158). Vionnet et al. publicaram um estudo demonstrando uma associação inversa do alelo raro T do rs5400 com a ND em pacientes portadores de DM1 (71). No presente estudo, foi possível constatar uma associação do alelo raro T deste SNP com a ND incipiente na fase basal, tanto nas coortes SURGENE quanto nas coortes GENESIS/GENEDIAB. Estas diferenças observadas entre esses estudos poderiam ser explicadas, entre outras coisas, pelos critérios de inclusão distintos utilizados na seleção dos pacientes; Vionnet et al., utilizaram apenas pacientes com macroalbuminúria, não considerando em suas análises pacientes com microalbuminúria. No presente estudo a associação observada foi justamente com a ND incipiente, sendo que não foi possível observar nenhuma associação deste polimorfismo com a ND estabilizada/avançada ou com a incidência de eventos renais ou de IRCT nas coortes SURGENE e GENESIS/GENEDIAB, respectivamente. A funcionalidade deste SNP ainda não foi estabelecida e sabe-se que



ele encontra-se em forte DL com dois SNPs presentes na região promotora do gene (158). Desta forma seu efeito poderia ser devido a uma alteração nas concentrações da proteína ou mesmo por uma modificação da função proteica devido a mudança de aminoácidos (157). Além disso, o rs5400 está em forte DL com os SNPs rs11720145 e rs11920090, que já se mostraram associados com doença cardiovascular em pacientes portadores de DM2 (70).

O rs11924032 mostrou-se associado com a incidência de IRCT nas coortes GENESIS/GENEDIAB bem como com a perda da função renal ao longo do estudo na coorte SURGENE. Este SNP encontra-se na região intrônica do gene *SLC2A2*, mais precisamente no íntron 2. Não há dados na literatura referente a este SNP e a maneira pela qual ele poderia modular a expressão do gene *SLC2A2*. De maneira geral, nossos dados não sugerem um efeito muito relevante dos SNPs estudados neste gene no mecanismo de desenvolvimento da ND em pacientes portadores de DM1.

Os resultados observados para os SNPs diferem entre as coortes. Estas diferenças podem ser explicadas pelas divergências nos critérios de seleção e nas características clínicas entre as coortes estudadas. A coorte SURGENE foi delineada de maneira prospectiva, apresentando pacientes mais jovens e com um tempo de DM mais curto, dos quais cerca de 38% e 18% apresentavam algum grau de retinopatia e ND, respectivamente. As coortes GENESIS e GENEDIAB foram inicialmente delineadas como um estudo transversal, porém graças a atualização dos dados, em uma parcela dos pacientes (cerca de 2/3), foi possível realizar a análise dos dados de maneira prospectiva com relação IRCT. Estas coortes, embora semelhantes, possuem algumas diferenças, principalmente relacionadas à gravidade da ND (mais evidente entre os pacientes da coorte GENEDIAB). Entretanto, quando comparados com os pacientes pertencentes à coorte SURGENE, os pacientes das coortes GENESIS e GENEDIAB eram, no momento

da inclusão, mais velhos, com mais tempo de DM e todos apresentavam algum grau de retinopatia diabética, sendo que 58% deles apresentavam retinopatia diabética proliferativa. Com relação aos estágios de ND, 57% dos pacientes apresentavam qualquer grau de ND no momento da inclusão. A coorte brasileira foi delineada como um estudo transversal, no qual os pacientes possuem idade e tempo de DM semelhantes à coorte SURGENE, com cerca de 64% e 45% dos pacientes apresentando qualquer grau de retinopatia e ND, respectivamente.

A retinopatia diabética pode ser considerada como um possível fator de confusão nas análises, uma vez que assim como a ND, pode sofrer influência de genes presentes nas vias pró- e antioxidantes. As diferenças no grau de retinopatia diabética relatada nas coortes enfatiza as diferenças nos critérios de seleção dos pacientes. As análises foram ajustadas pelo grau de retinopatia para que dessa forma este possível viés possa ser minimizado. Associações com a retinopatia diabética foram encontradas apenas para o SNP rs12709102 no gene *CYBA*.

Algumas limitações podem ser listadas nesse trabalho: a coorte brasileira e a coorte SURGENE apresentam um número relativamente baixo de pacientes, assim como há baixa incidência de IRCT nas coortes GENESIS/GENEDIAB (cerca de 7%) no seguimento do estudo. Embora estes fatos possam influenciar o poder estatístico do estudo em algumas análises, não acreditamos que esta limitação explique as diferenças de resultados observados entre as coortes, uma vez que o poder observado foi suficiente.

Não é possível excluir uma possível ocorrência de um erro tipo I (falso positivo) nas análises, todavia, os resultados foram replicados em quatro coortes (com exceção do rs9932581 no gene *CYBA*, o qual não apresentou resultados positivos na coorte brasileira) o que diminui a probabilidade do resultado refletir uma mera coincidência estatística. Em todos os casos de replicação, os mesmos alelos de cada SNPs

mostraram-se associados, seja com a proteção seja com o risco de prevalência e/ou incidência de ND ou de alteração na TFG<sub>e</sub>. Mesmo nas associações estratificadas por sexo, foi possível perceber a mesma associação sexo-dependente nas diferentes coortes.

O DL das variantes com outras variantes funcionais no mesmo gene, ou em outros genes presentes no mesmo cromossoma entre as coortes pode influenciar os resultados observados e possivelmente algumas diferenças podem também ter sido influenciadas, em parte, pelas diferenças étnicas existentes entre as coortes francesas e brasileiras. Entretanto as frequências alélicas entre as coortes foram semelhantes, minimizando este efeito.

A ND é uma doença multifatorial com envolvimento de fatores ambientais, além dos próprios mecanismos genéticos. Observado individualmente, o impacto de um gene não é fator predominante e ele pode ser mascarado pelos efeitos poligênicos que influenciam a ND e pelas próprias condições de tratamento do DM. Entretanto, o impacto do estresse oxidativo no desenvolvimento das complicações diabética, tais como a ND, é extensamente discutido na literatura científica.

No presente trabalho foi possível identificar associações de SNPs presentes nos genes *GPX4*, *CYBB*, *CAT*, *CYBA* e *SLC2A2* com a ND em pacientes portadores de DM1. As associações observadas para os genes *GPX4*, *CYBB*, e *CAT*, foram replicadas tanto nas coortes francesas quanto na coorte brasileira. A associação do SNP rs9932581 no gene *CYBA* com a ND nas coortes francesas não foi observada na coorte brasileira, no entanto, estudos prévios de nosso grupo demonstraram associação de outro SNP localizado no gene *CYBA* com uma TFG<sub>e</sub> inferior a 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Este fato reforça a hipótese de que a associação existente para um determinado SNP pode ser influenciada pelas diferenças entre populações. As associações observadas para o gene

*SLC2A2* não foram analisadas na coorte brasileira, pois os resultados observados nas coortes francesas sugeriram uma associação pouco significativa com a ND.

Os resultados do presente estudo permitem afirmar que SNPs localizados nos genes *GPX4*, *CYBB*, *CAT* e *CYBA*, presentes em vias pró- e antioxidantes influenciam o estabelecimento e evolução da ND, corroborando a importância do estresse oxidativo na etiopatogênese da ND.

## 6. Conclusões

No presente estudo foi possível concluir que:

- O alelo raro T do rs713041 no gene *GPX4* foi inversamente associado com a prevalência de ND estabilizada/avançada e associado com valores elevados de TFG<sub>e</sub>, nas coortes brasileira e francesa, respectivamente, no sexo masculino.
- O alelo raro A do polimorfismo rs6610650 no gene *CYBB*, mostrou-se associado com valores baixos de TFG<sub>e</sub> e com a prevalência de ND estabilizada/avançada, nas coortes brasileira e francesas, respectivamente, no sexo feminino.
- O alelo raro A do rs7947841 no gene *CAT* foi associado com a prevalência de ND incipiente e estabilizada/avançada nos pacientes de descendência europeia das coortes SURGENE e GENEDIAB, bem como na coorte brasileira, que se caracteriza por importante mistura étnica. Este mesmo alelo foi associado com a incidência de eventos renais e de IRCT nas coortes SURGENE e GENESIS/GENEDIAB, respectivamente.
- O alelo raro T do rs9932581 no gene *CYBA* foi inversamente associado com a prevalência de ND estabilizada/avançada e associado com valores mais baixos de TFG<sub>e</sub> nos pacientes de descendência europeia da coorte GENESIS/GENEDIAB. Este mesmo alelo foi associado com a incidência de eventos renais e de IRCT nas coortes SURGENE e GENESIS/GENEDIAB, respectivamente. Nenhuma associação deste SNP foi observada na coorte brasileira.

## 7. Anexos

### ANEXO A – Coorte SURGENE: frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CAT* de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal.

Polimorfismos	Ausência de nefropatia	Nefropatia incipiente	Nefropatia estabilizada/avançada	OR (IC 95% ) para nefropatia incipiente	<i>p</i>	OR (IC 95%) Para nefropatia estabilizada e avançada	<i>p</i>
N	280	36	24				
rs1001179*				<b>1,79 (1,17 – 2,79)</b>	<b>0,008</b>	0,68 (0,29 – 1,46)	0,34
GG	0,638	0,394	0,789				
GA	0,307	0,515	0,158				
AA	0,055	0,091	0,053				
MAF	0,209	0,349	0,132				
rs2300182				0,63 (0,23 – 1,45)	0,31	0,79 (0,17 – 3,09)	0,87
AA	0,724	0,781	0,789				
AT	0,249	0,219	0,211				
TT	0,027	0,000	0,000				
MAF	0,152	0,110	0,106				
rs11032703				0,44 (0,13 – 1,25)	0,16	1,03 (0,22 – 4,42)	0,97
CC	0,768	0,848	0,650				
CT	0,220	0,152	0,350				
TT	0,012	0,000	0,000				
MAF	0,122	0,076	0,175				
rs2300181				0,49 (0,22 – 1,00)	0,06	0,85 (0,28 – 2,51)	0,77
GG	0,483	0,655	0,500				
GA	0,433	0,310	0,444				
AA	0,084	0,035	0,056				
MAF	0,301	0,190	0,278				

**ANEXO A – Coorte SURGENE: frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CAT* de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal (Conclusão).**

<b>Polimorfismos</b>	<b>Ausência de nefropatia</b>	<b>Nefropatia incipiente</b>	<b>Nefropatia estabilizada/avançada</b>	<b>OR (IC 95% ) para nefropatia incipiente</b>	<b><i>p</i></b>	<b>OR (IC 95%) Para nefropatia estabilizada e avançada</b>	<b><i>p</i></b>
N	280	36	24				
rs10488736				0,59 (0,29 – 1,14)	0,13	1,07 (0,38 – 2,95)	0,90
CC	0,462	0,636	0,444				
CT	0,437	0,303	0,500				
TT	0,101	0,061	0,056				
MAF	0,320	0,213	0,306				
rs2420388				1,64 (0,86 – 3,08)	0,13	2,58 (0,97 – 7,23)	0,06
CC	0,579	0,437	0,550				
CT	0,361	0,500	0,250				
TT	0,060	0,063	0,200				
MAF	0,241	0,313	0,325				
rs566979				0,56 (0,29 – 1,03)	0,07	0,83 (0,33 – 2,04)	0,69
TT	0,396	0,545	0,400				
TG	0,443	0,394	0,500				
GG	0,161	0,061	0,100				
MAF	0,383	0,258	0,350				
rs7947841				<b>2,79 (1,21 – 6,24)</b>	<b>0,01</b>	<b>5,72 (1,62 – 22,03)</b>	<b>0,007</b>
GG	0,812	0,667	0,650				
GA	0,180	0,300	0,300				
AA	0,008	0,033	0,050				
MAF	0,098	0,183	0,200				

**ANEXO A – Coorte SURGENE: frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CAT* de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal (Conclusão).**

<b>Polimorfismos</b>	<b>Ausência de nefropatia</b>	<b>Nefropatia incipiente</b>	<b>Nefropatia estabilizada/avançada</b>	<b>OR (IC 95%) para nefropatia incipiente</b>	<b><i>p</i></b>	<b>OR (IC 95%) Para nefropatia estabilizada e avançada</b>	<b><i>p</i></b>
N	280	36	24				
rs499406				1,21 (0,69 – 2,13)	0,50	0,61 (0,24 – 1,42)	0,20
GG	0,418	0,303	0,500				
GA	0,426	0,515	0,350				
AA	0,156	0,182	0,150				
MAF	0,369	0,440	0,325				

Os polimorfismos estão alinhados no sentido 5'-3'.

OR (*odds ratio*) para o alelo raro determinado em um modelo codominante de regressão logística (\*dominante) ajustado por sexo, idade, tempo de DM, tratamento anti-hipertensivo, HbA1c e retinopatia. Retinopatia foi codificada como uma covariável politômica ordinal: ausência de retinopatia (1), retinopatia diabética não-proliferativa (2), retinopatia diabética pré-proliferativa (3) ou retinopatia diabética proliferativa (4). MAF: do inglês *minor allele frequency*.  $p \leq 0,02$  foi considerado significativo.



**ANEXO B- Frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CAT* de acordo com a incidência de eventos renais (Coorte SURGENE) ou insuficiência renal crônica terminal (Coorte GENEDIAB).**

	Coorte SURGENE: incidência de eventos renais				Coorte GENEDIAB: incidência de insuficiência renal crônica terminal			
	Não	Sim	HR (IC 95%)	p	Não	Sim	HR (IC 95%)	p
N	242	98			253	30		
rs1001179			0,91 (0,62 – 1,30)	0,59			1,19 (0,50 – 1,56)	0,55
GG	0,608	0,660			0,633	0,571		
GA	0,338	0,268			0,283	0,357		
AA	0,054	0,072			0,084	0,072		
MAF	0,223	0,206			0,226	0,251		
rs2300182			0,77 (0,46 – 1,21)	0,27			2,27 (0,83 – 5,38)	0,10
AA	0,716	0,781			0,773	0,760		
AT	0,257	0,208			0,199	0,200		
TT	0,027	0,011			0,028	0,040		
MAF	0,156	0,115			0,128	0,140		
rs11032703			1,29 (0,76 – 2,07)	0,34			0,74 (0,25 – 1,76)	0,54
CC	0,792	0,670			0,789	0,840		
CT	0,199	0,320			0,189	0,120		
TT	0,009	0,010			0,022	0,040		
MAF	0,109	0,170			0,117	0,100		
rs2300181			0,97 (0,65 – 1,42)	0,88			1,11 (0,60 – 2,15)	0,75
GG	0,495	0,546			0,534	0,360		
GA	0,427	0,386			0,351	0,640		
AA	0,078	0,068			0,115	0,000		
MAF	0,292	0,261			0,291	0,320		
rs10488736			1,09 (0,74 – 1,57)	0,66			1,16 (0,64 – 2,14)	0,63
CC	0,486	0,505			0,456	0,320		
CT	0,412	0,429			0,368	0,600		
TT	0,102	0,066			0,176	0,080		
MAF	0,308	0,281			0,360	0,380		

**ANEXO B - Frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CAT* de acordo com a incidência de eventos renais (Coorte SURGENE) ou insuficiência renal crônica terminal (Coorte GENEDIAB) (Conclusão).**

	Coorte SURGENE: incidência de eventos renais				Coorte GENEDIAB: incidência de insuficiência renal crônica terminal			
	Não	Sim	HR (IC 95%)	p	Não	Sim	HR (IC 95%)	p
N	242	98			253	30		
rs2420388			1,29 (0,90 – 1,81)	0,17			<b>2,80 (1,31 – 5,98)</b>	<b>0,009</b>
CC	0,574	0,531			0,640	0,520		
CT	0,356	0,408			0,273	0,400		
TT	0,070	0,061			0,087	0,080		
MAF	0,248	0,265			0,224	0,280		
rs566979			0,91 (0,65 – 1,27)	0,60			0,73 (0,39 – 1,29)	0,27
TT	0,406	0,448			0,404	0,393		
TG	0,441	0,437			0,388	0,536		
GG	0,153	0,115			0,208	0,071		
MAF	0,373	0,333			0,402	0,339		
rs7947841			1,82 (1,13 – 2,81)	0,01			<b>2,11 (1,23 – 3,60)</b>	<b>0,008</b>
GG	0,812	0,725			0,816	0,720		
GA	0,179	0,255			0,178	0,280		
AA	0,009	0,020			0,006	0,000		
MAF	0,098	0,147			0,095	0,140		
rs499406			0,94 (0,67 – 1,31)	0,72			0,55 (0,26 – 1,07)	0,08
GG	0,433	0,330			0,451	0,440		
GA	0,392	0,546			0,358	0,480		
AA	0,175	0,124			0,191	0,080		
MAF	0,371	0,397			0,370	0,320		

Os polimorfismos estão alinhados no sentido 5'-3'.

HR (*hazard ratio*) para o alelo raro determinado em um modelo codominante de regressão logística ajustado por sexo, idade, tempo de DM, uso de inibidor da enzima de conversor (GENEDIAB), tratamento anti-hipertensivo, HbA1c e retinopatia. Retinopatia foi codificada como uma covariável politômica ordinal: ausência de retinopatia (1), retinopatia diabética não-proliferativa (2), retinopatia diabética pré-proliferativa (3) ou retinopatia diabética proliferativa (4). MAF: do inglês *minor allele frequency*.  $p \leq 0,02$  foi considerado significativo.

**ANEXO C – Coorte GENEDIAB: frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CAT* de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal.**

Polimorfismos	Ausência de nefropatia	Nefropatia incipiente	Nefropatia estabilizada/avançada	OR (IC 95%) para nefropatia incipiente	<i>p</i>	OR (IC 95%) Para nefropatia estabilizada e avançada	<i>p</i>
N	134	96	214				
rs1001179				1,31 (0,75 – 2,28)	0,33	1,59 (1,00 – 2,59)	0,05
GG	0,698	0,641	0,583				
GA	0,259	0,326	0,347				
AA	0,043	0,033	0,070				
MAF	0,173	0,196	0,244				
rs2300182				0,85 (0,47 – 1,49)	0,57	0,84 (0,50 – 1,40)	0,50
AA	0,732	0,723	0,758				
AT	0,211	0,229	0,216				
TT	0,057	0,048	0,026				
MAF	0,163	0,163	0,134				
rs11032703				0,57 (0,25 – 1,23)	0,16	0,80 (0,42 – 1,53)	0,49
CC	0,803	0,866	0,825				
CT	0,189	0,122	0,155				
TT	0,008	0,012	0,020				
MAF	0,103	0,073	0,098				
rs2300181				0,83 (0,50 – 1,37)	0,47	0,82 (0,53 – 1,28)	0,38
GG	0,484	0,512	0,562				
GA	0,383	0,417	0,366				
AA	0,133	0,071	0,072				
MAF	0,325	0,280	0,255				
rs10488736				0,71 (0,44 – 1,13)	0,15	0,61 (0,40 – 0,92)	0,02
CC	0,381	0,439	0,479				
CT	0,424	0,439	0,420				
TT	0,195	0,122	0,101				
MAF	0,407	0,342	0,311				

**ANEXO C – Coorte GENEDIAB: frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CAT* de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal (Conclusão).**

Polimorfismos	Ausência de nefropatia	Nefropatia incipiente	Nefropatia estabilizada/avançada	OR (IC 95%) para nefropatia incipiente	<i>p</i>	OR (IC 95%) Para nefropatia estabilizada e avançada	<i>p</i>
N	134	96	214				
rs2420388				1,26 (0,79 – 2,03)	0,32	0,88 (0,23 – 1,27)	0,58
CC	0,582	0,530	0,577				
CT	0,311	0,337	0,365				
TT	0,107	0,133	0,058				
MAF	0,263	0,302	0,241				
rs566979				0,89 (0,58 – 1,36)	0,59	<b>0,63 (0,42 – 0,93)</b>	<b>0,02</b>
TT	0,326	0,358	0,445				
TG	0,457	0,453	0,426				
GG	0,217	0,189	0,129				
MAF	0,445	0,415	0,342				
rs7947841				<b>3,13 (1,42 – 7,24)</b>	<b>0,004</b>	2,14 (1,00 – 4,79)	0,05
GG	0,827	0,726	0,799				
GA	0,165	0,262	0,196				
AA	0,008	0,012	0,005				
MAF	0,090	0,143	0,103				
rs499406				0,87 (0,54 – 1,37)	0,55	1,44 (0,97 – 2,19)	0,07
GG	0,545	0,549	0,356				
GA	0,333	0,329	0,497				
AA	0,122	0,122	0,147				
MAF	0,289	0,287	0,396				

Os polimorfismos estão alinhados no sentido 5'-3'.

OR (*odds ratio*) para o alelo raro determinado em um modelo codominante de regressão logística ajustado por sexo, idade, tempo de DM, uso de inibidor da enzima de conversora, tratamento anti-hipertensivo, HbA1c e retinopatia. Retinopatia foi codificada como uma covariável politômica ordinal: ausência de retinopatia (1), retinopatia diabética não-proliferativa (2), retinopatia diabética pré-proliferativa (3) ou retinopatia diabética proliferativa (4). MAF: do inglês *minor allele frequency*.  $p \leq 0,02$  foi considerado significativo.

**ANEXO D – Coorte brasileira: Frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CAT* de acordo com os estágios de nefropatia diabética.**

Polimorfismos	Ausência de nefropatia	Nefropatia incipiente	Nefropatia estabilizada/avançada	OR (IC 95%) para nefropatia incipiente	<i>p</i>	OR (IC 95%) Para nefropatia estabilizada e avançada	<i>p</i>
N	250	82	121				
rs566979				0,75 (0,49 – 1,16)	0,20	0,80 (0,52 – 1,23)	0,31
TT	0,342	0,321	0,339				
TG	0,451	0,531	0,483				
GG	0,207	0,148	0,178				
MAF	0,432	0,413	0,419				
rs7947841				2,16 (1,14 – 4,10)	0,02	<b>2,71 (1,38 – 5,42)</b>	<b>0,004</b>
GG	0,774	0,692	0,729				
GA	0,210	0,295	0,237				
AA	0,016	0,013	0,034				
MAF	0,121	0,160	0,152				

Os polimorfismos estão alinhados no sentido 5'-3'.

OR (*odds ratio*) para o alelo raro determinado em um modelo codominante de regressão logística ajustado por sexo, idade, tempo de DM, uso de IECA, HbA1c e retinopatia. Retinopatia foi codificada como uma covariável politômica ordinal: ausência de retinopatia (1), retinopatia diabética não-proliferativa (2), retinopatia diabética pré-proliferativa (3) ou retinopatia diabética proliferativa (4). MAF: do inglês *minor allele frequency*.

$p < 0,025$  foi considerado significativo.

**ANEXO E – Coorte SURGENE: frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CYBA* de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal.**

<b>Polimorfismos</b>	<b>Ausência de nefropatia</b>	<b>Nefropatia incipiente</b>	<b>Nefropatia estabilizada/avançada</b>	<b>OR (IC 95%) para nefropatia incipiente</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%) Para nefropatia estabilizada e avançada</b>	<b>p</b>
N	280	36	24				
rs9932581				0,71 (0,22 – 2,20)	0,56	0,25 (0,04 – 1,34)	0,12
CC	0,361	0,367	0,435				
CT	0,474	0,500	0,435				
TT	0,165	0,133	0,130				
MAF	0,402	0,383	0,347				
-675 T/A				1,42 (0,19 – 7,84)	0,70	0,55 (0,02 – 6,98)	0,67
TT	0,877	0,870	0,806				
TA	0,112	0,130	0,194				
AA	0,011	0,000	0,000				
MAF	0,067	0,065	0,097				
rs3794624				0,21 (0,05 – 0,79)	0,03	0,42 (0,07 – 2,23)	0,33
GG	0,430	0,634	0,524				
GA	0,457	0,333	0,238				
AA	0,114	0,033	0,238				
MAF	0,342	0,199	0,357				
rs4673				1,45 (0,37 – 5,34)	0,58	1,38 (0,22 – 8,30)	0,72
CC	0,475	0,400	0,600				
CT	0,448	0,520	0,200				
TT	0,077	0,080	0,200				
MAF	0,301	0,268	0,300				

**ANEXO E – Coorte SURGENE: frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CYBA* de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal (Conclusão).**

Polimorfismos	Ausência de nefropatia	Nefropatia incipiente	Nefropatia estabilizada/avançada	OR (IC 95%) para nefropatia incipiente	p	OR (IC 95%) Para nefropatia estabilizada e avançada	p
N	280	36	24				
rs12709102				0,20 (0,05 – 0,70)	0,01	0,16 (0,02 – 0,91)	0,05
TT	0,321	0,500	0,500				
TC	0,517	0,433	0,364				
CC	0,162	0,067	0,136				
MAF	0,420	0,283	0,318				
rs1049255				0,28 (0,07 – 0,99)	0,05	0,10 (0,01 – 0,63)	0,02
AA	0,256	0,286	0,392				
GA	0,515	0,643	0,478				
GG	0,229	0,071	0,130				
MAF	0,486	0,392	0,369				
rs11076692				0,52 (0,15 – 1,68)	0,28	0,13 (0,02 – 0,72)	0,02
TT	0,255	0,241	0,364				
CT	0,502	0,552	0,454				
CC	0,243	0,207	0,182				
MAF	0,494	0,483	0,409				

Os polimorfismos estão alinhados em sequência 5' para 3'

OR (*odds ratio*) e Intervalo de Confiança (IC) 95% para o alelo raro em um modelo codominante de regressão logística ajustada para sexo, idade, tempo de DM, índice de massa corpórea e pressão arterial sistólica. MAF: do inglês *minor allele frequency*;  $p \leq 0,01$  foi considerado significativo.

**ANEXO F - Frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CYBA* de acordo com a incidência de eventos renais (Coorte SURGENE) ou insuficiência renal crônica terminal (Coorte GENESIS/GENEDIAB).**

	*Coorte SURGENE: incidência de eventos renais				#Coorte GENESIS/GENEDIAB: incidência de insuficiência renal crônica terminal			
	Não	Sim	HR (IC 95%)	p	Não	Sim	HR (IC 95%)	p
Polimorfismos	242	98			690	55		
rs9932581			<b>0,63 (0,46 – 0,86)</b>	<b>0,003</b>			<b>0,51 (0,31 – 0,78)</b>	<b>0,002</b>
CC	0,344	0,424			0,375	0,572		
CT	0,493	0,424			0,425	0,367		
TT	0,163	0,152			0,200	0,061		
MAF	0,407	0,364			0,412	0,244		
-675 T/A			1,12 (0,64 – 1,82)	0,67			0,50 (0,16 – 1,13)	0,10
TT	0,873	0,859			0,856	0,920		
TA	0,122	0,120			0,131	0,080		
AA	0,005	0,021			0,013	0,000		
MAF	0,065	0,081			0,078	0,040		
rs3794624			1,13 (0,83 – 1,53)	0,43			0,96 (0,62 – 1,47)	0,87
GG	0,475	0,407			0,462	0,429		
GA	0,416	0,465			0,414	0,490		
AA	0,109	0,128			0,124	0,081		
MAF	0,322	0,360			0,331	0,326		
rs4673			1,14 (0,81 – 1,60)	0,44			0,90 (0,57 – 1,37)	0,62
CC	0,491	0,444			0,436	0,429		
CT	0,416	0,489			0,421	0,449		
TT	0,093	0,067			0,143	0,122		
MAF	0,298	0,303			0,353	0,346		



**ANEXO F - Frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CYBA* de acordo com a incidência de eventos renais (Coorte SURGENE) ou insuficiência renal crônica terminal (Coorte GENESIS/GENEDIAB) (Conclusão).**

	*Coorte SURGENE: incidência de eventos renais				#Coorte GENESIS/GENEDIAB: incidência de insuficiência renal crônica terminal			
	Não	Sim	HR (IC 95%)	p	Não	Sim	HR (IC 95%)	p
Polimorfismos	242	98			690	55		
rs12709102			1,08 (0,80 – 1,44)	0,62			1,06 (0,71 – 1,58)	0,76
TT	0,352	0,344			0,364	0,347		
TC	0,498	0,500			0,461	0,449		
CC	0,150	0,156			0,175	0,204		
MAF	0,399	0,406			0,405	0,428		
rs1049255			1,01 (0,75 – 1,37)	0,93			1,02 (0,67 – 1,55)	0,91
AA	0,274	0,256			0,289	0,250		
GA	0,511	0,556			0,473	0,500		
GG	0,215	0,188			0,237	0,250		
MAF	0,465	0,466			0,473	0,500		
rs11076692			1,00 (0,74 – 1,35)	0,99			1,00 (0,68 – 1,49)	0,98
TT	0,263	0,259			0,277	0,255		
CT	0,502	0,506			0,460	0,468		
CC	0,235	0,235			0,263	0,277		
MAF	0,484	0,488			0,493	0,511		

Os polimorfismos estão ordenados no sentido 5'-3'.

\*HR (*hazards ratio*) para o alelo raro determinado em um modelo codominante de regressão de risco proporcional de Cox, ajustado por sexo, idade, tempo de DM, índice de massa corpórea, pressão arterial sistólica, média da pressão arterial sistólica ao longo do tempo de estudo, uso de inibidores da enzima conversora na fase basal e ao final do estudo, tratamento para hipertensão arterial sistêmica e progressão de retinopatia diabética.

#HR (*hazards ratio*) para o alelo raro determinado em um modelo codominante de regressão de risco proporcional de Cox, ajustado por coorte, sexo, idade, tempo de DM, índice de massa corpórea, uso da enzima conversora e de bloqueadores do receptor de angiotensina, HbA1c e retinopatia diabética. Retinopatia foi codificada como uma covariável politômica ordinal: ausência de retinopatia (1), retinopatia diabética não-proliferativa (2), retinopatia diabética pré-proliferativa (3) ou retinopatia diabética proliferativa (4). MAF: do inglês *minor allele frequency*;  $p \leq 0,01$  foi considerado significativo.

**ANEXO G - Coorte GENESIS/GENEDIAB: Frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CYBA* de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal.**

Polimorfismos	Ausência de nefropatia	Nefropatia incipiente	Nefropatia estabilizada/avançada	OR (IC 95%) para nefropatia incipiente	p	OR (IC 95%) Para nefropatia estabilizada e avançada	p
N	386	197	362				
rs9932581				0,80 (0,61 – 1,05)	0,11	<b>0,60 (0,46 – 0,78)</b>	<b>0,0001</b>
CC	0,320	0,376	0,423				
CT	0,460	0,423	0,420				
TT	0,220	0,201	0,158				
MAF	0,450	0,413	0,368				
-675 T/A				0,84 (0,50 – 1,39)	0,49	0,93 (0,58 – 1,49)	0,77
TT	0,865	0,869	0,857				
TA	0,124	0,131	0,132				
AA	0,011	0,000	0,011				
MAF	0,073	0,065	0,077				
rs3794624				0,76 (0,57 – 1,02)	0,07	0,79 (0,60 – 1,03)	0,09
GG	0,447	0,527	0,469				
GA	0,438	0,353	0,450				
AA	0,115	0,120	0,081				
MAF	0,334	0,297	0,306				
rs4673				0,89 (0,67 – 1,17)	0,39	0,91 (0,70 – 1,18)	0,48
CC	0,429	0,451	0,464				
CT	0,444	0,424	0,396				
TT	0,127	0,125	0,140				
MAF	0,349	0,337	0,338				

**ANEXO G - Coorte GENESIS/GENEDIAB: Frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CYBA* de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal (Conclusão).**

Polimorfismos	Ausência de nefropatia	Nefropatia incipiente	Nefropatia estabilizada/avançada	OR (IC 95%.) para nefropatia incipiente	p	OR (IC 95%.) Para nefropatia estabilizada e avançada	p
N	386	197	362				
rs12709102				1,08 (0,82 – 1,42)	0,59	1,11 (0,86 – 1,43)	0,44
TT	0,368	0,346	0,374				
TC	0,489	0,464	0,401				
CC	0,143	0,190	0,225				
MAF	0,387	0,422	0,425				
rs1049255				1,06 (0,81 – 1,39)	0,65	1,10 (0,85 – 1,42)	0,47
AA	0,299	0,258	0,266				
GA	0,484	0,506	0,454				
GG	0,217	0,236	0,280				
MAF	0,459	0,489	0,507				
rs11076692				1,02 (0,78 – 1,32)	0,91	1,09 (0,84 – 1,40)	0,51
TT	0,273	0,254	0,268				
CT	0,494	0,508	0,437				
CC	0,233	0,238	0,295				
MAF	0,480	0,492	0,513				

Os polimorfismos estão alinhados no sentido 5'-3'. OR (*odds ratio*) para o alelo raro determinado em um modelo codominante de regressão logística ajustado por coorte, sexo, idade, tempo de DM, índice de massa corpórea, uso de inibidor da enzima conversora e sartan, HbA1c e retinopatia. Retinopatia foi codificada como uma covariável politômica ordinal: ausência de retinopatia (1), retinopatia diabética não-proliferativa (2), retinopatia diabética pré-proliferativa (3) ou retinopatia diabética proliferativa (4).

MAF: do inglês *minor allele frequency*

p≤0,01 foi considerado significante

**ANEXO H – Coorte brasileira: Frequência genotípica dos polimorfismos no gene *CYBA* de acordo com os estágios de nefropatia diabética.**

<b>Polimorfismo</b>	<b>Ausência de nefropatia</b>	<b>Nefropatia incipiente</b>	<b>Nefropatia estabilizada/avançada</b>	<b>OR (IC 95%) para nefropatia incipiente</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%) Para nefropatia estabilizada e avançada</b>	<b>p</b>
N	250	82	121				
rs9932581				0,92 (0,61 – 1,38)	0,69	1,31 (0,90 – 1,90)	0,16
CC	0,330	0,383	0,284				
CT	0,519	0,481	0,483				
TT	0,150	0,136	0,233				
MAF	0,409	0,376	0,474				

OR (*odds ratio*) para o alelo raro determinado em um modelo codominante de regressão logística ajustado por sexo, idade, tempo de DM, índice de massa corpórea.

MAF: do inglês *minor allele frequency*

p≤0,025 foi considerado significante.

**ANEXO I – Coorte SURGENE: frequência genotípica dos SNPs no gene *SLC2A2* de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal.**

SNP	Ausência de nefropatia	Nefropatia incipiente	Nefropatia estabilizada/avançada	OR (IC 95%) para nefropatia incipiente	<i>p</i>	OR (IC 95%) Para nefropatia estabilizada e avançada	<i>p</i>
N	280	36	24				
rs11720145				<b>3,25 (1,33 – 7,98)</b>	<b>0,01</b>	0,68 (0,15 – 3,00)	0,56
GG	0,762	0,500	0,826				
GA	0,223	0,500	0,130				
AA	0,015	0,000	0,044				
MAF	0,126	0,250	0,109				
rs11924032				1,33 (0,56 – 3,14)	0,64	0,75 (0,21 – 2,61)	0,39
GG	0,488	0,400	0,546				
GA	0,421	0,500	0,318				
AA	0,091	0,100	0,136				
MAF	0,301	0,350	0,295				
rs5400				<b>2,60 (1,07 – 6,27)</b>	<b>0,03</b>	0,71 (0,16 -3,14)	0,65
CC	0,769	0,567	0,826				
CT	0,215	0,433	0,130				
TT	0,016	0,000	0,044				
MAF	0,123	0,216	0,109				
rs11920090				<b>2,77 (1,14 – 6,70)</b>	<b>0,02</b>	0,79 (0,18 – 3,50)	0,70
AA	0,780	0,567	0,818				
TA	0,205	0,433	0,136				
TT	0,015	0,000	0,046				
MAF	0,117	0,216	0,118				

**ANEXO I – Coorte SURGENE: frequência genotípica dos SNPs no gene *SLC2A2* de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal (Conclusão).**

SNP	Ausência de nefropatia	Nefropatia incipiente	Nefropatia estabilizada/avançada	OR (IC 95%) para nefropatia incipiente	<i>p</i>	OR (IC 95%) Para nefropatia estabilizada e avançada	<i>p</i>
N	280	36	24				
rs5398				1,55 (0,64 – 3,74)	0,41	0,44 (0,11 – 1,71)	0,11
CC	0,465	0,323	0,571				
TC	0,435	0,548	0,286				
TT	0,100	0,129	0,143				
MAF	0,317	0,403	0,286				

Os SNPs estão alinhados no sentido 5'-3'.

OR (*odds ratio*) determinado em um modelo dominante para o alelo raro de regressão logística ajustado por sexo, idade, tempo de DM, uso de IECA e HbA1c.

MAF: do inglês *minor allele frequency*

$p \leq 0,03$  foi considerado significativo.

**ANEXO J - Frequência genotípica dos polimorfismos de um único nucleotídeo no gene *SLC2A2* de acordo com a incidência de eventos renais (Coorte SURGENE) ou insuficiência renal crônica terminal (Coorte GENESIS/GENEDIAB).**

	*Coorte SURGENE: incidência de eventos renais				#Coorte GENESIS/GENEDIAB: incidência de insuficiência renal crônica terminal			
	Não	Sim	HR (IC 95%)	p	Não	Sim	HR (IC 95%)	p
N	242	98			690	55		
rs11720145			0,83 (0,51 – 1,25)	0,39			1,02 (0,49 – 1,91)	0,95
GG	0,734	0,764			0,738	0,804		
GA	0,248	0,225			0,244	0,174		
AA	0,018	0,011			0,018	0,022		
MAF	0,142	0,123			0,140	0,109		
rs11924032			1,00 (0,73 – 1,34)	0,99			<b>0,53 (0,29 – 0,89)</b>	<b>0,01</b>
GG	0,491	0,467			0,536	0,702		
GA	0,412	0,444			0,397	0,255		
AA	0,097	0,089			0,067	0,043		
MAF	0,303	0,311			0,265	0,170		
rs5400			0,82 (0,50 – 1,25)	0,37			0,87 (0,40 – 1,67)	0,69
CC	0,745	0,775			0,736	0,826		
CT	0,237	0,214			0,245	0,152		
TT	0,018	0,011			0,018	0,022		
MAF	0,136	0,118			0,140	0,098		
rs11920090			0,85 (0,53 – 1,29)	0,47			0,91 (0,44 – 1,69)	0,78
AA	0,760	0,769			0,736	0,808		
TA	0,222	0,220			0,242	0,170		
TT	0,018	0,011			0,022	0,021		
MAF	0,129	0,121			0,143	0,097		

**ANEXO J - Frequência genotípica dos polimorfismos de um único nucleotídeo no gene *SLC2A2* de acordo com a incidência de eventos renais (Coorte SURGENE) ou insuficiência renal crônica terminal (Coorte GENESIS/GENEDIAB) (Conclusão).**

	*Coorte SURGENE: incidência de eventos renais				#Coorte GENESIS/GENEDIAB: incidência de insuficiência renal crônica terminal			
	Não	Sim	HR (IC 95%)	p	Não	Sim	HR (IC 95%)	p
N	242	98			690	55		
rs5398			0,99 (0,73 – 1,31)	0,99			<b>0,60 (0,36 – 0,96)</b>	<b>0,03</b>
CC	0,468	0,433			0,493	0,638		
TC	0,419	0,478			0,411	0,298		
TT	0,113	0,089			0,096	0,064		
MAF	0,322	0,328			0,301	0,213		

Os SNPs estão alinhados no sentido 5'-3'.

\*HR (*hazard ratio*) para o alelo raro determinado em um modelo codominante de regressão logística ajustado por sexo, idade, tempo de DM, uso de IECA, e HbA1c.

#HR (*hazard ratio*) para o alelo raro determinado em um modelo codominante de regressão logística ajustado por coorte, sexo, idade, tempo de DM, PAS, HbA1c e retinopatia diabética proliferativa.

MAF: do inglês *minor allele frequency*

p≤0,03 foi considerado significante.



**ANEXO K – Coorte GENESIS/GENEDIAB: frequência genotípica dos polimorfismos de um único nucleotídeo no gene *SLC2A2* de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal.**

SNP	Ausência de nefropatia	Nefropatia incipiente	Nefropatia estabilizada/avançada	OR (IC 95%) para nefropatia incipiente	<i>p</i>	OR (IC 95%) Para nefropatia estabilizada e avançada	<i>p</i>
N	476	229	400				
rs11720145				1,60 (1,03 – 2,49)	0,04	1,41 (0,89 – 2,23)	0,14
GG	0,750	0,691	0,751				
GA	0,227	0,279	0,235				
AA	0,023	0,030	0,014				
MAF	0,136	0,169	0,131				
rs11924032				1,01 (0,69 – 1,49)	0,95	0,93 (0,63 – 1,38)	0,72
GG	0,533	0,522	0,549				
GA	0,391	0,404	0,370				
AA	0,076	0,074	0,081				
MAF	0,271	0,276	0,266				
rs5400				<b>1,68 (1,08 – 2,61)</b>	<b>0,02</b>	1,40 (0,88 – 2,22)	0,15
CC	0,752	0,679	0,746				
CT	0,225	0,291	0,246				
TT	0,023	0,030	0,008				
MAF	0,135	0,175	0,131				
rs11920090				1,60 (1,03 – 2,48)	0,04	1,49 (0,95 – 2,37)	0,08
AA	0,741	0,684	0,740				
TA	0,231	0,286	0,251				
TT	0,028	0,030	0,009				
MAF	0,143	0,173	0,134				

**ANEXO K – Coorte GENESIS/GENEDIAB: frequência genotípica dos polimorfismos de um único nucleotídeo no gene *SLC2A2* de acordo com os estágios de nefropatia diabética na fase basal (conclusão).**

SNP	Ausência de nefropatia	Nefropatia incipiente	Nefropatia estabilizada/avançada	OR (IC 95%) para nefropatia incipiente	<i>p</i>	OR (IC 95%) Para nefropatia estabilizada e avançada	<i>p</i>
N	476	229	400				
rs5398				1,03 (0,70 – 1,53)	0,84	0,97 (0,65 – 1,43)	0,87
CC	0,490	0,485	0,507				
TC	0,407	0,412	0,403				
TT	0,103	0,103	0,090				
MAF	0,306	0,309	0,291				

Os SNPs estão alinhados no sentido 5'-3'.

OR (*odds ratio*) para o alelo raro determinado em um modelo codominante de regressão logística ajustado por coorte, sexo, idade, tempo de DM, PAS, HbA1c, tratamento pós HAS, uso de IECA e Sartan e retinopatia. Retinopatia foi codificada como uma covariável politômica ordinal: ausência de retinopatia (1), retinopatia diabética não-proliferativa (2), retinopatia diabética pré-proliferativa (3) ou retinopatia diabética proliferativa (4).

MAF: do inglês *minor allele frequency*

$p \leq 0,03$ , foi considerado significativo.

**ANEXO L – Parecer da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da USP****COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA****PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Associação entre Polimorfismos em Genes que Codificam Proteínas Pró- e Antioxidantes e a Susceptibilidade à Nefropatia em Coortes Francesas de Portadores de Diabetes Tipo 1: Validação de Resultados Observados em uma Casuística Brasileira.

**Pesquisador:** Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

**Área Temática:** Área 8. Pesquisa com cooperação estrangeira.

**Versão:** 4

**CAAE:** 02583112.8.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 194.443

**Data da Relatoria:** 18/02/2013

**Apresentação do Projeto:**

Várias evidências sugerem que uma predisposição genética determine a susceptibilidade às complicações crônicas do diabetes melito (DM), juntamente com a hiperglicemia crônica, hipertensão arterial e dislipidemia. Uma vez que o estresse oxidativo foi reconhecido como o elemento final comum das vias bioquímicas induzidas pela hiperglicemia, os genes que codificam enzimas pró- e antioxidantes são candidatos a conferirem susceptibilidade às complicações. A produção exacerbada de superóxido estimula quebra da dupla fita de DNA

ativando uma enzima que diminui a função da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Uma diminuição na função desta enzima acaba por acumular os produtos de decomposição da glicose que servem como substratos para outra vias, que por sua vez geram produtos que culminam em danos teciduais. Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram a associação entre vários polimorfismos de sistemas pró-oxidantes e risco para a presença de nefropatia diabética em portadores de DM tipo 1.

**Hipótese:**

Polimorfismos situados na região promotora ou próxima a ela, podem estar envolvidos com uma maior ou menor expressão do gene em questão. Tendo vista o mecanismo de unificação proposto

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** conep@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA**

na literatura de que o excesso de radical superóxido proveniente do processo de transporte de elétrons na fosforilação oxidativa induzida pela hiperglicemia, pode ser crucial para o desenvolvimento das complicações do diabetes melito, as variações alélicas nestes SNPs podem apresentar uma maior ou menor atividade das enzimas codificadas pelos genes e com isso contribuir para o desenvolvimento da nefropatia em pacientes com diabetes melito tipo 1.

**Metodologia:**

Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, serão coletados 5 mL de sangue em tubo a vácuo contendo EDTA. As amostras serão acondicionadas em caixa de isopor com gelo para transporte e em seguida será realizado o procedimento de extração do RNA genômico. Para a genotipagem dos pacientes será utilizado o equipamento de PCR em tempo real, StepOnePlus (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), que permite o processamento de 96 amostras de DNA simultaneamente (em placas). Este ensaio de genotipagem detectará as variantes alélicas de um SNP, sem quantificar o alvo. Para a quantificação do mRNA presente nas células sanguíneas será utilizado o sistema Taqman, que consiste no uso de sondas fluorescentes que se ligam especificamente a uma região interna do produto de PCR. A extração do mRNA será feito pelo método de TRIzol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

Critérios de Inclusão/ Exclusão: não consta

**Objetivo da Pesquisa:**

Estudar se SNPs em vias anti oxidantes e oxidantes que se associaram com o acometimento renal em uma casuística brasileira de portadores de DM1 também conferem susceptibilidade a essa complicação crônica em portadores de DM1 de três coortes francesas, bem como analisar em uma casuística brasileira se o SNP - 224T/A no gene TXN (rs2301242) pode ser funcional.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:****Riscos:**

O único desconforto que o participante sentirá será a retirada do sangue onde será realizada a pesquisa de alterações em seu material genético. Os riscos deste procedimento são baixos, como a formação de hematomas ou pequeno sangramento local.

**Benefícios:**

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

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.750-521  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA**

indicar a prioridade para futuras estratégias de prevenção e de controle intensivo dos portadores de diabetes com maior risco de desenvolver essas doenças associadas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Não se aplica.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Não se aplica.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

1. Alguns termos obrigatórios não foram preenchidos:

a) Falta a Classificação internacional de doenças. Solicita-se sua apresentação no protocolo.

Resposta: Conforme mencionado anteriormente, o modelo simplificado ao qual temos acesso na Plataforma Brasil não permite editar a parte da Classificação Internacional de Doenças, razão pela qual isso não foi feito.

Análise: Pendência atendida

b) Faltam os Critérios de Inclusão/ Exclusão. Apesar do pesquisador responder no documento "Resposta Pendência.doc" que a amostra brasileira será de 30 pacientes, ele não deixa claro os "Critérios de Inclusão/Exclusão" e o local do recrutamento no documento "Projeto\_de\_Pesquisa\_Corrigido.doc", nem nos dados preenchidos na Plataforma Brasil. Solicita-se apresentação.

Resposta: Os critérios de inclusão foram inseridos no Projeto\_de\_Pesquisa\_Corrigido2 e estão reproduzidos abaixo: Serão selecionados 30 pacientes já acompanhados no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da FMUSP e que já foram genotipados em estudo prévio (Estudo da associação entre polimorfismos em genes que codificam proteínas de vias antioxidantes endógenas e a susceptibilidade a doença renal em pacientes portadores de diabetes tipo 1, Aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa, CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da FMUSP, Protocolo de Pesquisa nº 0803/09). Esses pacientes apresentam mais de 10 anos de duração do diabetes mellitus tipo 1 e apresentaram hemoglobina glicada (HbA1c) > 8% em algum período de suas vidas.

Análise: Pendência atendida

2. O Orçamento Financeiro necessita ser mais detalhado. Nas "Informações, justificativas ou

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.750-521  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA**

considerações a critério do pesquisador" onde lê-se: "Não haverá obtenção de recursos externos, pois os materiais necessários para a realização da pesquisa já foram obtidos com verba oriunda de auxílio financeiro concedido por agência de fomento. O aluno recebe bolsa FAPESP no valor integral de 40.201,92 dos quais 3.654,72 são referentes à reserva técnica. Esta verba será utilizada para o pagamento da hospedagem do aluno no período em que ele estiver em Paris. O pesquisador não receberá nenhuma remuneração para a realização do presente projeto." No entanto, não há detalhamento dos gastos financeiros. Solicita-se apresentação de novo orçamento financeiro.

Resposta: Conforme solicitado, o orçamento foi detalhado e o orçamento demonstrado será utilizado para a análise da expressão do gene TXN nos 30 pacientes com os três possíveis genótipos para esse polimorfismo.

Análise: Pendência atendida

Quanto ao TCLE:

3) O TCLE deve ser iniciado em forma de convite ao participante. Solicita-se adequação.

Resposta: Conforme solicitado, o TCLE foi reformulado.

Análise: Pendência atendida

4) No item 4 sobre Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3, lê-se: "Os riscos deste procedimento são mínimos, como a formação de hematomas ou pequeno sangramento local. Caso ocorra algum problema após a coleta do sangue, o (a) Sr (a) será atendido no próprio ambulatório médico do Hospital das Clínicas pelo médico responsável pela pesquisa."

a) O pesquisador cita apenas 2 riscos, que não são os únicos, nem os mais graves que podem surgir da coleta de sangue. Existem outros riscos que podem requerer maior assistência e acompanhamento por parte do responsável pelo estudo, como por exemplo, infecção ou outros problemas oriundos da técnica ou de procedimentos médicos. Considerar a definição de risco prevista na Resolução CNS 196 de 1996 e adequar o referido parágrafo no TCLE. Solicita-se que seja reescrito.

Resposta: Conforme solicitado, o TCLE foi reformulado.

Análise: Pendência atendida

5) Deve ser bem esclarecido a garantia de assistência, acompanhamento e indenização por

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.750-521  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA**

qualquer dano causado pelo procedimento do estudo. Ressalta-se que o paciente sempre tem direito à indenização por danos relacionados à pesquisa, conforme itens V.5 e V.6 da Resolução CNS 196/96. Solicita-se que sejam incluídas no TCLE garantias de compromisso explícito por parte dos responsáveis pelo estudo garantindo assistência, acompanhamento e indenização por dano decorrente da pesquisa.

Resposta: Conforme solicitado, o TCLE foi reformulado.

Análise: Pendência atendida.

6) Deve estar garantida as formas de ressarcimento das despesas financeiras (transporte e alimentação) decorrentes da participação na pesquisa, por exemplo, no dia da coleta do material, em concordância com o item IV.1 letra h da Res. CNS 1 196 de 1996. Solicita-se adequação no TCLE.

Resposta: Conforme solicitado, o TCLE foi reformulado.

Análise: O pesquisador reescreve este parágrafo da seguinte forma, para atender o solicitado: "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. Todos os procedimentos necessários para o estudo serão realizados no dia de sua consulta. Caso haja despesas adicionais com transporte e alimentação, por necessidade de comparecimento ao ambulatório fora do dia da sua consulta, serão ressarcidas". Considerando que o participante estará nas dependências de realização da pesquisa devido a sua consulta médica de rotina aceitou-se a argumentação acima com relação ao ressarcimento de despesas. Pendência atendida.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Considerações Finais a critério da CONEP:**

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.750-521  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



BRASILIA, 06 de Fevereiro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Aníbal Gil Lopes**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.750-521  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br



ANEXO M – Artigo publicado no periódico *Free Radical Research*.

*Free Radical Research*, 2013; Early Online: 1–7  
 © 2013 Informa UK, Ltd.  
 ISSN 1071-5762 print/ISSN 1029-2470 online  
 DOI: 10.3109/10715762.2013.828347

**informa**  
 healthcare

ORIGINAL ARTICLE

### Sex-specific associations of variants in regulatory regions of NADPH oxidase-2 (*CYBB*) and glutathione peroxidase 4 (*GPX4*) genes with kidney disease in type 1 diabetes

M. B. Monteiro<sup>1#</sup>, T. A. Patente<sup>1,2#</sup>, K. Mohammedi<sup>2,3</sup>, M. S. Queiroz<sup>4</sup>, M. J. Azevedo<sup>5</sup>, L. H. Canani<sup>5</sup>, M. C. Parisi<sup>6</sup>, M. Marre<sup>2,3,7</sup>, G. Velho<sup>2#</sup> & M. L. Corrêa-Giannella<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM-25), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brazil, <sup>2</sup>INSERM, Research Unit 695, Paris, France, <sup>3</sup>Assistance Publique Hôpitaux de Paris – Department of Diabetology, Endocrinology and Nutrition, Bichat Hospital, Paris, France, <sup>4</sup>Divisão de Endocrinologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brazil, <sup>5</sup>Divisão de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, <sup>6</sup>Divisão de Endocrinologia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil, and <sup>7</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UFR de Médecine, Paris, France

#### Abstract

Oxidative stress is involved in the pathophysiology of diabetic nephropathy. The superoxide-generating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase 2 (NOX2, encoded by the *CYBB* gene) and the antioxidant enzyme glutathione peroxidase 4 (GPX4) play opposing roles in the balance of cellular redox status. In the present study, we investigated associations of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the regulatory regions of *CYBB* and *GPX4* with kidney disease in patients with type 1 diabetes. Two functional SNPs, rs6610650 (*CYBB* promoter region, chromosome X) and rs713041 (*GPX4* 3' untranslated region, chromosome 19), were genotyped in 451 patients with type 1 diabetes from a Brazilian cohort (diabetic nephropathy: 44.6%) and in 945 French/Belgian patients with type 1 diabetes from Genesis and GENEDIAB cohorts (diabetic nephropathy: 62.3%). The minor A-allele of *CYBB* rs6610650 was associated with lower estimated glomerular filtration rate (eGFR) in Brazilian women, and with the prevalence of established/advanced nephropathy in French/Belgian women (odds ratio 1.75, 95% CI 1.11–2.78,  $p = 0.016$ ). The minor T-allele of *GPX4* rs713041 was inversely associated with the prevalence of established/advanced nephropathy in Brazilian men (odds ratio 0.30, 95% CI 0.13–0.68,  $p = 0.004$ ), and associated with higher eGFR in French/Belgian men. In conclusion, these heterogeneous results suggest that neither *CYBB* nor *GPX4* are major genetic determinants of diabetic nephropathy, but nevertheless, they could modulate in a gender-specific manner the risk for renal disease in patients with type 1 diabetes.

**Keywords:** diabetic nephropathy, oxidative stress, genetic susceptibility, GPX4, NOX2

#### Introduction

It is now widely accepted that genetic factors modulate the susceptibility to diabetic complications, including diabetic nephropathy [1], and that oxidative stress mediates target tissue lesions caused by chronic hyperglycaemia [2]. Therefore, genes related to cellular redox status are interesting candidates for genetic studies of diabetic complications.

The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase (NOX) system transports electrons across the plasma membrane and generates superoxide and other downstream reactive oxygen species (ROS) [3]. NOX1, NOX2 and NOX4 catalytic subunits are highly expressed in the kidney [4]. Their activation requires association with the regulatory subunit p22phox (encoded by the *CYBA* gene) [3]. Increased expression of NOX2 (encoded by the *CYBB* gene) and p22phox were observed in the kidney of rats with diabetic nephropathy [5,6] and

allelic variations of *CYBA* were shown to be associated with kidney disease in patients with type 1 diabetes [7,8].

Glutathione (GSH) is an important endogenous antioxidant, and it was reported that plasma GSH concentration is decreased in patients with diabetes [9]. Glutathione peroxidases (GPXs) catalyse the reduction of hydrogen peroxide or of lipid hydroperoxides to water or lipid alcohols, respectively, using GSH as an electron donor [10]. The phospholipid hydroperoxide GPX (GPX4) is an intracellular selenoprotein, expressed in most tissues, that reduces lipid hydroperoxides and regulates leukotriene biosynthesis and cytokine signalling pathways [11].

The aim of the present study was to investigate associations of single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the regulatory regions of *CYBB* and *GPX4* with diabetic nephropathy. We studied a Brazilian cohort and two French/Belgian cohorts of subjects with type 1 diabetes.

<sup>#</sup>Equal contributors.

Correspondence: Prof. Maria Lúcia Corrêa-Giannella, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM-25), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455 #4305, 01246-903, São Paulo-SP, Brazil. Tel: +5511 30618453. E-mail: malugia@lim25.fm.usp.br

(Received date: 5 July 2013; Accepted date: 18 July 2013; Published online: 19 August 2013)

**RIGHTS LINK**  
 Copyright Clearance Center

2 M. B. Monteiro et al.

## Methods

### Participants: Brazilian cohort

The cohort comprised 451 patients with type 1 diabetes for more than 10 years (56% women; aged  $36 \pm 11$  years, mean  $\pm$  SD) recruited in diabetes/endocrinology departments of three university hospitals in the cities of São Paulo (SP), Campinas (SP) and Porto Alegre (RS), Brazil. Type 1 diabetes was diagnosed in patients presenting hyperglycaemia, positive autoantibodies (glutamic acid decarboxylase [GAD], islet cell antibodies or tyrosine phosphatase-like insulinoma antigen 2 [IA-2]) and undetectable C-peptide or ketoacidosis. Patients with estimated glomerular filtration rate (eGFR)  $< 60$  ml/min who did not present diabetic retinopathy were excluded from the study. Participants, individually and as a group, had a mixed ethnic background (African, Amerindian, Asian and European Caucasian of several different countries of origin), which reflects the Brazilian population [12].

### Participants: French/Belgian Cohorts

The Genesis France-Belgian Study and the "Génétiq ue de la Néphropathie Diabétique" (GENEDIAB) study were cross-sectional, multi-centre, binational (Belgian and France) studies designed to evaluate the genetic components of diabetic nephropathy. Genesis was a family-based study in which probands with type 1 diabetes were selected on the basis of a diagnosis of diabetes before the age of 35 years, with initial ketosis and requirement for permanent insulin treatment within 1 year of diagnosis and past or present diagnosis of diabetic retinopathy [13]. In the present investigation we studied 501 probands, including 279 individuals (55.7%), with diagnosis of diabetic nephropathy. GENEDIAB included 444 patients with type 1 diabetes, selected on the basis of diagnosis of diabetes before the age of 35 years and past or present diagnosis of severe diabetic retinopathy [14]. Diabetic nephropathy was present in 310 individuals (69.8%).

### Clinical methods – Diabetic nephropathy and retinopathy stages

eGFR was calculated according to Modification of Diet in Renal Disease formula (MDRD) [15]. Urinary albumin-to-creatinine ratio (ACR) or urinary albumin excretion rates (UAER) were used to define diabetic nephropathy in the Brazilian cohort. Absence of nephropathy was defined as ACR  $< 30$  mg/g of creatinine or UAER  $< 20$   $\mu$ g/min or  $< 20$  mg/L and plasma creatinine  $< 1.7$  mg/dL; incipient nephropathy was defined as persistent microalbuminuria (ACR 30–300 mg/g of creatinine or UAER 20–200  $\mu$ g/min or 20–200 mg/L) and plasma creatinine  $< 1.7$  mg/dL; established diabetic nephropathy was defined as past or present macroalbuminuria (ACR  $> 300$  mg/g of creatinine or UAER  $> 200$   $\mu$ g/min or  $> 200$  mg/L) and plasma creatinine  $< 1.7$  mg/dL; advanced diabetic nephropathy was defined as past or present macroalbuminuria, plasma

creatinine  $> 1.7$  mg/dL and any renal replacement therapy. UAER was measured in 24-h urine samples by immunoturbidimetry and ACR was measured in spot urine samples using nephelometry, in at least two samples collected over the preceding 6 months. In the French/Belgian cohorts, stages of diabetic nephropathy were defined similarly as described above, based on UAER [16]. Retinopathy was staged according to Kohner's classification as non-proliferative, pre-proliferative or proliferative retinopathy, with data obtained by direct funduscopy and/or fluorescein angiography [17].

### Genotype analysis

Two SNPs were selected based on previous studies. The *CYBB* promoter rs6610650 ( $-2810$  A  $>$  G, chromosome X) was found to be in high LD with a functional TAdinucleotide microsatellite in the promoter region [18]. The *GPX4* rs713041 ( $+718$  C  $>$  T, chromosome 19) is located within the 3' untranslated region (3'UTR) and was found to have a direct functional impact on *GPX4* synthesis, expression and action [19–22]. Samples from the Brazilian cohort were genotyped by real-time PCR using fluorescent-labelled probes (c\_29975415\_10 for *CYBB* rs6610650 and c\_2561693\_20 for *GPX4* rs713041) from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) and procedures recommended by the manufacturer. Amplifications were performed on an Applied Biosystems StepOne Plus Real-Time PCR System (30 s at 60°C, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of PCR [15 s at 95°C followed by 60 s at 60°C] and 30 s at 60°C). Genotyping of samples from the French/Belgian cohorts was made by Kbioscience/LGC Genomics (Hoddesdon, UK) using KASP assays, a proprietary competitive allele-specific PCR genotyping system (<http://www.lgcgenomics.com/genotyping>). Genotyping success rate was  $> 95\%$  in all studies. Genotyping was repeated in 5–15% of subjects and 100% concordance was observed. *GPX4* rs713041 was in Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) in all cohorts ( $p = 0.22$  in the Brazilian cohort and  $p = 0.74$  in the French/Belgian Cohorts), while *CYBB* rs6610650 was in HWE in women from the French/Belgian cohorts ( $p = 0.23$ ), but not in those from the Brazilian cohort ( $p = 0.003$ ). As men are hemizygous for chromosome X variants, HWE could not be assessed in men for *CYBB* rs6610650.

### Statistical analyses

Results are expressed as mean  $\pm$  SD except where stated otherwise. Continuous variables were log-transformed for the analyses when the normality of the distribution was rejected by the Shapiro–Wilk W-test. Fisher's exact test, ANOVA and ANCOVA were used for comparisons between groups. Comparisons of eGFR across genotypes (ANCOVA) were adjusted for age, duration of diabetes, HbA1c and, in the French-Belgian pooled studies, for cohort membership. Genetic associations with diabetic nephropathy were assessed by logistic regression analyses.

Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were computed in these analyses for the minor alleles. Adjustments for clinical and biological parameters were carried out by including them as covariates in the regressive model. In the French/Belgian cohorts, genetic analyses were adjusted for the diabetic retinopathy stage to take into account differences in the cohorts resulting from different inclusion criteria. To increase power, subjects with established and advanced diabetic nephropathy were pooled for genetic analyses. Interaction between sex and genotype was assessed by including in the regression models (ANCOVA or logistic regression) a "crossed" compound covariate (sex/genotype). The stratification by sex was then performed by nesting the genotype variable within the sex variable in the analysis model. This results in the computation of statistical effects for men and women separately, and adjusted for multiple comparisons due to the stratification by sex. Moreover, as two independent SNPs were tested, a Bonferroni correction was applied:  $p < 0.025$  was considered significant, unless stated otherwise. The power to detect sex-specific associations of the SNPs with established/advanced nephropathy in the Brazilian cohort and in the French/Belgian cohorts was ~65% and ~90%, respectively, for  $OR \geq 1.5$  and  $\alpha = 0.05$ . Statistics were performed with the JMP software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

#### Ethics

The study was carried out in compliance with the Declaration of Helsinki. Study protocols were approved by the ethics committee of authors' institutions: "Hospital das

#### CYBB and GPX4 variants in diabetic nephropathy 3

Clínicas da Universidade de São Paulo", "Hospital de Clínicas de Porto Alegre" and "Hospital das Clínicas da UNICAMP" for the Brazilian cohort, and Angers University Hospital for the French/Belgium cohort. All participants gave written informed consent.

#### Results

##### Brazilian cohort

The clinical characteristics of patients by diabetic nephropathy stages are shown in Table I. Individuals with established or advanced nephropathy as compared to those with normal UAE had higher blood pressure levels and decreased renal function. Diabetic retinopathy increased in frequency and severity with the severity of diabetic nephropathy.

Association studies with diabetic nephropathy stages were not performed for *CYBB* rs6610650, because the variant was not in HWE in this cohort. As the comparison of continuous biological parameters is less likely to be affected by absence of HWE, we assessed eGFR across *CYBB* rs6610650 genotypes. There was an interaction between sex and genotype in the comparison of eGFR by genotypes ( $p = 0.04$  for the interaction covariate). We observed no significant differences in eGFR between A-allele and G-allele carriers in the group of men:  $77 \pm 5$  versus  $81 \pm 3$   $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} / 1.73 \text{ m}^2$ , respectively (mean  $\pm$  SEM,  $p = 0.43$ ). However, in the group of women, eGFR was significantly lower in AA than in AG or GG carriers:  $64 \pm 7$ ,  $78 \pm 4$  and  $79 \pm 3$   $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} / 1.73 \text{ m}^2$ , respectively ( $p = 0.02$ ).

Table I. Clinical characteristics of the patients according to diabetic nephropathy stages in the Brazilian cohort.

	Absence of nephropathy	Incipient nephropathy	Established nephropathy	Advanced nephropathy	P
N	250	82	56	63	
Age (years)	36 $\pm$ 12	36 $\pm$ 11	34 $\pm$ 9	36 $\pm$ 9	0.69
Sex: M/F (%)	38/62	46/54	54/46	49/51	0.07
Age at diabetes onset (years)	14 $\pm$ 9	13 $\pm$ 7	15 $\pm$ 8	13 $\pm$ 7	0.19
Duration of diabetes (years)	22 $\pm$ 8	24 $\pm$ 10	20 $\pm$ 5	22 $\pm$ 6	0.09
HbA <sub>1c</sub> (%)	8.7 $\pm$ 1.9	8.8 $\pm$ 1.9	9.3 $\pm$ 2.6	8.7 $\pm$ 2.4	0.33
Systolic blood pressure (mmHg)	118 $\pm$ 15	120 $\pm$ 19	126 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	134 $\pm$ 28 <sup>a,b</sup>	< 0.0001
Diastolic blood pressure (mmHg)	76 $\pm$ 10	77 $\pm$ 11	83 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	84 $\pm$ 16 <sup>a,b</sup>	< 0.0001
Arterial Hypertension (%)	34	46	53	85	< 0.0001
Plasma creatinine (mg/dl)	0.91 $\pm$ 0.37	0.98 $\pm$ 0.20	1.08 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	4.20 $\pm$ 2.93 <sup>a,b,c</sup>	< 0.0001
eGFR ( $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} / 1.73 \text{ m}^2$ )	93 $\pm$ 27	83 $\pm$ 21	79 $\pm$ 30 <sup>a</sup>	25 $\pm$ 17 <sup>a,b,c</sup>	< 0.0001
ACE inhibitor treatment (%)	19	43	30	29	0.0002
Total Cholesterol (mg/dl)	178 $\pm$ 35	169 $\pm$ 36	204 $\pm$ 62 <sup>a,b</sup>	188 $\pm$ 68	0.0006
LDL Cholesterol (mg/dl)	99 $\pm$ 27	94 $\pm$ 25	118 $\pm$ 57	104 $\pm$ 60	0.0764
HDL Cholesterol (mg/dl)	61 $\pm$ 17	57 $\pm$ 20	61 $\pm$ 18	58 $\pm$ 22	0.0880
Triglycerides (mg/dl)	85 $\pm$ 51	98 $\pm$ 58	124 $\pm$ 72 <sup>a</sup>	151 $\pm$ 118 <sup>a,b</sup>	< 0.0001
Hypolipidemic treatment (%)	17	25	31	34	0.0089
Diabetic retinopathy stages (%)	51/24/5/20	33/16/6/45	12/33/8/47	2/9/3/86	< 0.0001

Results expressed as means  $\pm$  SD. Statistics of quantitative variables are ANOVA performed with log-transformed data. Tukey Kramer HSD test following ANOVA: significantly different ( $p < 0.05$ ) from values in subjects without nephropathy (a) or with incipient nephropathy (b) or with established nephropathy (c).

Arterial hypertension: systolic blood pressure (SBP) > 140 mmHg and/or diastolic blood pressure (DBP) > 90 mmHg or presence of antihypertensive medication and history of hypertension.

Diabetic retinopathy stages: Absence, Non-Proliferative, Pre-Proliferative, Proliferative.

4 M. B. Monteiro et al.

Genotype frequency of *GPX4* rs713041 by nephropathy stages is shown in Table II. We observed a significant interaction between sex and genotype in the comparison of diabetic nephropathy stages by genotype ( $p = 0.001$  for the interaction covariate). There was an inverse association of the minor T-allele with established/advanced nephropathy in the group of men (OR 0.30, 95% CI 0.13–0.68,  $p = 0.004$ ), while no association was observed in the group of women. These results are in keeping with genotype-related prevalences of established/advanced nephropathy in CC (43%), CT (28%) and TT (20%) men. No association with incipient diabetic nephropathy was observed in any of the groups. We observed no differences in eGFR across *GPX4* rs713041 genotypes in any of the groups. It was  $77 \pm 4$  (CC),  $81 \pm 3$  (CT) and  $83 \pm 5$  ml.min<sup>-1</sup>/1.73 m<sup>2</sup> (TT; mean  $\pm$  SEM,  $p = 0.55$ ) in the group of men, and  $79 \pm 4$  (CC),  $80 \pm 3$  (CT) and  $70 \pm 5$  ml.min<sup>-1</sup>/1.73 m<sup>2</sup> (TT;  $p = 0.24$ ) in the group of women.

#### French/Belgian cohorts

The clinical characteristics of patients by diabetic nephropathy stages were published previously [16] and are shown in supplementary material Tables I and II to be found at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10715762.2013.828347>. Briefly, in both cohorts, individuals with established or advanced nephropathy as compared to those with normal UAE had higher blood pressure levels, decreased renal function, and were more often taking ACE inhibitors and antihypertensive medication. Diabetic retinopathy increased in frequency and severity with the severity of diabetic nephropathy in the Genesis cohort but not in GENEDIAB, reflecting different inclusion criteria. Otherwise, clinical characteristics of Genesis and GENEDIAB participants were similar. To increase statistical power, genetic analyses were performed in pooled cohorts with appropriate covariate adjustments to take into account cohort differences.

Here again, we observed significant sex/genotype interactions in the comparisons of eGFR and diabetic nephropathy stages by genotype. Allele frequencies according to nephropathy stages are shown in Table III. We observed an association of the minor A-allele of *CYBB* rs6610650

with established/advanced nephropathy in the group of women (OR 1.75, 95% CI 1.11–2.78,  $p = 0.016$ ), while no association was observed in the group of men ( $p = 0.04$  for the sex/genotype interaction covariate). These results are in keeping with genotype-related prevalences of established/advanced nephropathy in AA (47%), AG (46%) and GG (36%) women. eGFR was not significantly different across *CYBB* rs6610650 genotype:  $72 \pm 7$  (AA),  $70 \pm 3$  (AG) and  $68 \pm 2$  ml.min<sup>-1</sup>/1.73 m<sup>2</sup> (GG;  $p = 0.72$ ) in women, and  $75 \pm 4$  (A) and  $75 \pm 2$  ml.min<sup>-1</sup>/1.73 m<sup>2</sup> (G;  $p = 0.97$ , mean  $\pm$  SEM) in men. We observed no association of *GPX4* rs713041 with diabetic nephropathy stages in the French/Belgian cohorts. However, in the group of men, eGFR was significantly higher in *GPX4* rs713041 TT than in CT or CC carriers:  $77 \pm 3$ ,  $70 \pm 2$  and  $73 \pm 3$  ml.min<sup>-1</sup>/1.73 m<sup>2</sup>, respectively ( $p = 0.007$ ; sex/genotype interaction covariate  $p = 0.04$ ). No genotype-related difference was observed for eGFR in the group of women:  $68 \pm 4$  (TT),  $65 \pm 2$  (CT) and  $68 \pm 3$  ml.min<sup>-1</sup>/1.73 m<sup>2</sup> (CC;  $p = 0.75$ ).

#### Discussion

The main findings of the present investigation in three cohorts of patients with type 1 diabetes are: first, an association of the minor A-allele of *CYBB* rs6610650 with lower eGFR in Brazilian women, and with the prevalence of established/advanced nephropathy in French/Belgian women. Secondly, an inverse association of the minor T-allele of *GPX4* rs713041 with the prevalence of established/advanced nephropathy in Brazilian men, as well as an association with higher eGFR in French/Belgian men.

We have no clear explanation for the heterogeneity of our results. This could be related to variable degrees of linkage disequilibrium (LD) of the SNPs in the three cohorts with other functional variants in *CYBB* and *GPX4* regions. It could also be related to phenotype differences due to different study designs and inclusion criteria in the Brazilian and French/Belgium cohorts. It might also be related to the genetic heterogeneity of the cohorts. In this regard, it is noteworthy that participants from the Brazilian cohort have important ethnic admixture, not only as a

Table II. Genotype frequencies of *GPX4* rs713041 by diabetic nephropathy stages in the Brazilian cohort.

	Absence of nephropathy	Incipient nephropathy	Established/Advanced nephropathy	OR (95% CI) for Incipient nephropathy	<i>P</i>	OR (95% CI) for Established/Advanced nephropathy	<i>p</i>
Women	( <i>n</i> = 152)	( <i>n</i> = 44)	( <i>n</i> = 56)				
CC	0.296	0.341	0.214				
CT	0.546	0.523	0.536	0.78 (0.37–1.66)	0.51	1.25 (0.57–2.88)	0.58
TT	0.158	0.136	0.250				
Men	( <i>n</i> = 91)	( <i>n</i> = 38)	( <i>n</i> = 58)				
CC	0.264	0.237	0.431				
CT	0.527	0.526	0.448	1.04 (0.42–2.80)	0.92	<b>0.30 (0.13–0.68)</b>	<b>0.004</b>
TT	0.209	0.237	0.121				

Odds ratio (OR) and 95% Confidence Interval (CI) for the minor allele in a dominant model, adjusted for age, duration of diabetes, arterial hypertension, HbA1c, triglycerides and use of hypolipidemic drugs.

$p < 0.025$  is significant.

Bold values indicate statistically significant results

Table III. Genesis/GENEDIAB pooled studies: genotype frequencies by diabetic nephropathy stages.

	Absence of nephropathy	Incipient nephropathy	Established/Advanced nephropathy	OR (95% CI) for Incipient nephropathy	<i>P</i>	OR (95% CI) for Established/Advanced nephropathy	<i>p</i>
<b>rs6610650 (CYBB)</b>							
Women	( <i>n</i> = 172)	( <i>n</i> = 86)	( <i>n</i> = 164)				
GG	0.767	0.686	0.646				
AG	0.216	0.256	0.311				
AA	0.017	0.058	0.043	1.49 (0.82–2.70)	0.19	<b>1.75 (1.11–2.78)</b>	<b>0.016</b>
Men	( <i>n</i> = 162)	( <i>n</i> = 115)	( <i>n</i> = 197)				
G	0.846	0.852	0.833				
A	0.154	0.148	0.167	0.90 (0.45–1.76)	0.76	1.03 (0.57–1.87)	0.92
<b>rs713041 (GPX4)</b>							
Women	( <i>n</i> = 170)	( <i>n</i> = 84)	( <i>n</i> = 161)				
CC	0.288	0.262	0.255				
CT	0.477	0.524	0.497				
TT	0.235	0.214	0.248	1.15 (0.76–1.73)	0.50	1.22 (0.82–1.80)	0.31
Men	( <i>n</i> = 160)	( <i>n</i> = 114)	( <i>n</i> = 197)				
CC	0.310	0.289	0.235				
CT	0.462	0.465	0.536				
TT	0.228	0.246	0.229	1.15 (0.79–1.67)	0.46	1.21 (0.84–1.74)	0.29

Odd ratio (OR) and 95% Confidence Interval (CI) for the minor allele in a dominant model, adjusted for age, duration of diabetes, retinopathy stage and cohort membership.

*p* < 0.025 is significant.

Bold values indicate statistically significant results.

group but also individually. The minor allele frequency (MAF) of *CYBB* rs6610650 was higher in the Brazilian cohort than in the French/Belgian cohorts (0.24 vs. 0.16). For comparison, rs6610650 MAF reported in the NCBI dbSNP for Asian, Caucasian and Sub-Saharan African populations is 0.01–0.10, ~0.10 and ~0.37, respectively ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=rs6610650](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs6610650)). MAF of *GPX4* rs713041 was similar in the Brazilian cohort and in the French/Belgian cohorts (0.44 vs. 0.48). Rs713041 MAF reported in the NCBI dbSNP for Asian, Caucasian and Sub-Saharan African populations is 0.39–0.48, 0.36–0.44 and ~0.30, respectively ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=rs713041](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs713041)). Finally, it is not possible to exclude that all our findings only reflect a type 1 error (false positive results). However, we believe this explanation is unlikely. Despite the fact that the SNPs were associated with different kidney outcomes in different cohorts, the same risk-allele for each SNP and similar sex-specific associations were observed in all cohorts. As the number of women and men in our cohorts are similar and thus the statistical power of the study was similar in both groups, it seems plausible that the sex-specific associations that we have observed have a biological rather than a purely statistical basis [23]. *CYBB* is located on chromosome X and sex-specific associations with complex traits, such as arterial hypertension, have been reported for other loci on that chromosome [24]. Moreover, women have higher *GPX4* concentrations than men [21], and rs713041 genotype-related differences in *GPX4* expression, activity and interaction with other selenoproteins in lymphocytes of healthy subjects were found to be modulated by sex [21].

As far as we know, this is the first study that investigates the role of allelic variation of *CYBB* in relation to diabetic nephropathy. *CYBB* mutations cause chronic granulomatous

disease, a primary immunodeficiency in which there is no measurable respiratory burst [25]. Moreover, a highly polymorphic TA-dinucleotide microsatellite, ~550 bp upstream the promoter, was shown to modulate promoter activity and to be associated with susceptibility to severe malaria [26]. It is noteworthy that the A-allele of *CYBB* rs6610650, which in our study is associated with a higher risk of diabetic nephropathy and with lower eGFR, was found to be in high LD with the (TA)<sub>15</sub> allele of the upstream microsatellite [18]. This allele was found to present higher NADPH activity and ROS production in neutrophils [26]. The role of NADPH-derived ROS in diabetic nephropathy is supported by a growing body of data [5–8]. This includes increased expression of NOX2 (*CYBB* gene) [6] and p22phox regulatory subunit (*CYBA* gene) [5] in the kidney of rats with diabetic nephropathy, as well as association of *CYBA* variants with nephropathy in subjects with type 1 diabetes [7,8].

*GPX4* rs713041 CC genotype was shown to be associated with stroke in subjects with essential hypertension [27] and with higher frequency of colorectal cancer [20], two conditions for which there is compelling evidence that increased oxidative stress is implicated in the pathogenesis [28–31]. Our findings of a protective effect of the T allele against kidney dysfunction in subjects with type 1 diabetes are consistent with those results. *GPX4* is a selenoprotein that contains selenium in the form of the 21st aminoacid, selenocysteine. Incorporation of selenocysteine occurs during translation and requires the presence of a mRNA stem-loop structure, selenocysteine insertion sequence (SECIS), located in the 3' UTR of selenoprotein mRNAs [32]. *GPX4* rs713041 is located near the predicted SECIS and there are robust experimental evidence suggesting that the variant have a direct functional impact on selenocysteine incorporation, *GPX4* synthesis, expression,

6 M. B. Monteiro et al.

interaction with other selenoproteins and response to an oxidative challenge [19–22].

Selenoproteins compete for available selenium, and when selenium supply is limiting, synthesis of some of these proteins is maintained at the expense of synthesis of others [33,34]. This prioritization depends on differences in the ability of their mRNA 3'UTR sequences to interact with the machinery of selenocysteine incorporation [22,33,34]. Rs713041 influences the relative position of GPX4 in the hierarchy of selenoprotein synthesis, and a mechanism based on this hierarchy of selenoprotein synthesis was proposed as the explanation for rs713041 C-allele deleterious effects. The C-allele is associated with higher expression of GPX4 [21], and increased synthesis of GPX4 leads to decreased synthesis of other selenoproteins such as GPX1 with a net result of increasing oxidative stress [20,27]. Moreover, the C-allele is associated with increased production of lipoxygenase products that could contribute to an abnormal tissue inflammatory response [27]. Studies in rodents showed that both GPX1 and GPX4 are highly expressed in the kidney [35], with GPX1 accounting for 96% of kidney GPX activity [36]. A nine to one ratio of GPX1/GPX4 expression was observed in human lymphocytes [21]. The mechanism of selenoprotein hierarchy also takes place in the kidney and under selenium deficiency GPX4 synthesis is protected at the expense of GPX1 synthesis [32]. Selenium deficiency have been reported in subjects with type 1 diabetes [37], and total GPX activity was found to be reduced in the kidney of rodent models of diabetes [38,39].

In conclusion, we have observed sex-specific associations of functional variants in the regulatory regions of *CYBB* and *GPX4* with various phenotypes related to diabetic nephropathy in Brazilian and French/Belgian cohorts of type 1 diabetes. Our heterogeneous results suggest that neither *CYBB* nor *GPX4* are major genetic determinants of diabetic nephropathy, but nevertheless, they could modulate in a sex-specific manner the risk for kidney disease in patients with type 1 diabetes.

#### Acknowledgments

We thank Maria Auxiliadora Higa and Ana Mercedes Cavaleiro for the technical support.

#### Declaration of interest

The authors report no declarations of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

The Brazilian part of the study was supported by grants from “São Paulo Research Foundation” (FAPESP; grants # 2009/09276-3, 2009/04162-0, and 2011/15015-8), “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) and “Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre” (FIPE-HCPA), Brazil. The French part of the work was supported by grants from

“Association Française des Diabétiques” (AFD), “Association Diabète Risque Vasculaire” (ADRV), and “Association L’Aide Aux Jeunes Diabétiques” (AJD), France.

#### References

- [1] Doria A. Genetics of diabetes complications. *Curr Diab Rep* 2010;10:467–475.
- [2] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813–820.
- [3] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007;87:245–313.
- [4] Gill PS, Wilcox CS. NADPH oxidases in the kidney. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1597–1607.
- [5] Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J, et al. Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment. *Diabetologia* 2003;46:1428–1437.
- [6] Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Quinn MT, Fujita T, Wilcox CS. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2005;67:1890–1898.
- [7] Hodgkinson AD, Millward BA, Demaine AG. Association of the p22phox component of NAD(P)H oxidase with susceptibility to diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:3111–3115.
- [8] Vieira SM, Monteiro MB, Marques T, Luna AM, Fortes MA, Nery M, et al. Association of genetic variants in the promoter region of genes encoding p22phox (CYBA) and glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) and renal disease in patients with type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genet* 2011;12:129.
- [9] Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P Jr, Reed RL, Jones DP. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 1998;24:699–704.
- [10] Doroshov JH, Akman S, Chu FF, Esworthy S. Role of the glutathione-glutathione peroxidase cycle in the cytotoxicity of the anticancer quinones. *Pharmacol Ther* 1990;47:359–370.
- [11] Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999;27:951–965.
- [12] Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 2006;62:190–195.
- [13] Hadjadj S, Pean F, Gallois Y, Passa P, Aubert R, Weekers L, et al. Different patterns of insulin resistance in relatives of type 1 diabetic patients with retinopathy or nephropathy: the Genesis France-Belgium Study. *Diabetes Care* 2004;27:2661–2668.
- [14] Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, et al. Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes: Genetique de la Nephropathie Diabétique (GENEDIAB) study group. *J Clin Invest* 1997;99:1585–1595.
- [15] 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;130:461–470.
- [16] Mohammadi K, Maimaitiming S, Emery N, Bellili-Munoz N, Roussel R, Fumeron F, et al. Allelic variations in superoxide dismutase-1 (SOD1) gene are associated with increased risk of diabetic nephropathy in type 1 diabetic subjects. *Mol Genet Metab* 2011;104:654–660.

*CYBB and GPX4 variants in diabetic nephropathy* 7

- [17] Kohner EM. The lesions and natural history of diabetic retinopathy. In: Pickup J, Williams G (ed.). *Text Book of Diabetes*. Oxford: Blackwell Scientific; 1991. pp. 575–588.
- [18] Soares-Souza GB, Tarazona-Santos E, Chanock SJ. Characterization of a candidate locus for malaria susceptibility in human populations: a (TA)<sub>n</sub> microsatellite in the promoter region of the *CYBB* gene, the gp91 phox subunit of the NADPH oxidase. *Int J Immunogenet* 2008;35:107–109.
- [19] Villette S, Kyle JA, Brown KM, Pickard K, Milne JS, Nicol F, et al. A novel single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of human glutathione peroxidase 4 influences lipoxigenase metabolism. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:174–178.
- [20] Bermanno G, Pagmantidis V, Holloway N, Kadri S, Mowat NA, Shiel RS, et al. Evidence that a polymorphism within the 3'UTR of glutathione peroxidase 4 is functional and is associated with susceptibility to colorectal cancer. *Genes Nutr* 2007;2:225–232.
- [21] Meplan C, Crosley LK, Nicol F, Horgan GW, Mathers JC, Arthur JR, Hesketh JE. Functional effects of a common single-nucleotide polymorphism (GPX4c718t) in the glutathione peroxidase 4 gene: interaction with sex. *Am J Clin Nutr* 2008; 87:1019–1027.
- [22] Gautrey H, Nicol F, Sneddon AA, Hall J, Hesketh J. A T/C polymorphism in the GPX4 3'UTR affects the selenoprotein expression pattern and cell viability in transfected Caco-2 cells. *Biochim Biophys Acta* 2011;1810:584–591.
- [23] Ober C, Loisel DA, Gilad Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nat Rev Genet* 2008;9:911–922.
- [24] Zhao Q, Gu D, Kelly TN, Hixson JE, Rao DC, Jaquish CE, et al. Association of genetic variants in the apelin-APJ system and ACE2 with blood pressure responses to potassium supplementation: the GenSalt study. *Am J Hypertens* 2010;23:606–613.
- [25] Tarazona-Santos E, Bernig T, Burdett L, Magalhaes WC, Fabbri C, Liao J, et al. *CYBB*, an NADPH-oxidase gene: restricted diversity in humans and evidence for differential long-term purifying selection on transmembrane and cytosolic domains. *Hum Mutat* 2008;29:623–632.
- [26] Uhlemann AC, Szlezak NA, Vonthein R, Tomiuk J, Emmer SA, Lell B, et al. DNA phasing by TA dinucleotide microsatellite length determines in vitro and in vivo expression of the gp91phox subunit of NADPH oxidase and mediates protection against severe malaria. *J Infect Dis* 2004;189:2227–2234.
- [27] Polonikov AV, Vialykh EK, Churnosov MI, Illig T, Freidin MB, Vasil'eva OV, et al. The C718T polymorphism in the 3'-untranslated region of glutathione peroxidase-4 gene is a predictor of cerebral stroke in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 2012;35:507–512.
- [28] Gasche C, Chang CL, Rhees J, Goel A, Boland CR. Oxidative stress increases frameshift mutations in human colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:7444–7448.
- [29] Goodman M, Bostick RM, Dash C, Terry P, Flanders WD, Mandel J. A summary measure of pro- and anti-oxidant exposures and risk of incident, sporadic, colorectal adenomas. *Cancer Causes Control* 2008;19:1051–1064.
- [30] Amantea D, Marrone MC, Nistico R, Federici M, Bagetta G, Bernardi G, Mercuri NB. Oxidative stress in stroke pathophysiology validation of hydrogen peroxide metabolism as a pharmacological target to afford neuroprotection. *Int Rev Neurobiol* 2009;85:363–374.
- [31] Nanetti L, Raffaelli F, Vignini A, Perozzi C, Silvestrini M, Bartolini M, et al. Oxidative stress in ischaemic stroke. *Eur J Clin Invest* 2011;41:1318–1322.
- [32] McCann JC, Ames BN. Adaptive dysfunction of selenoproteins from the perspective of the triage theory: why modest selenium deficiency may increase risk of diseases of aging. *FASEB J* 2011;25:1793–1814.
- [33] Bermanno G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR, Hesketh JE. Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem J* 1995;311:425–430.
- [34] Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ. Regulation and function of selenoproteins in human disease. *Biochem J* 2009;422:11–22.
- [35] de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, et al. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1998;273: 22528–22536.
- [36] de Haan JB, Stefanovic N, Nikolic-Paterson D, Scurr LL, Croft KD, Mori TA, et al. Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289: F544–F551.
- [37] Ruiz C, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda J. Selenium, zinc and copper in plasma of patients with type 1 diabetes mellitus in different metabolic control states. *J Trace Elem Med Biol* 1998;12:91–95.
- [38] Reddi AS, Bollineni JS. Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF-beta1 in normal and diabetic rats. *Kidney Int* 2001;59:1342–1353.
- [39] Sadi G, Eryilmaz N, Tutuncuoglu E, Cingir S, Guray T. Changes in expression profiles of antioxidant enzymes in diabetic rat kidneys. *Diabetes Metab Res Rev* 2012;28: 228–235.

**Supplementary material available online**

Supplementary Tables I and II.

ANEXO N – Artigo publicado no periódico *Diabetologia*.

Diabetologia  
DOI 10.1007/s00125-013-3057-z

ARTICLE

## Catalase activity, allelic variations in the catalase gene and risk of kidney complications in patients with type 1 diabetes

Kamel Mohammadi · Thiago A. Patente · Naïma Bellili-Muñoz · Fathi Driss · Maria Beatriz Monteiro · Ronan Roussel · Elizabeth J. Pavin · Nathalie Seta · Frédéric Fumeron · Mirela J. Azevedo · Luis H. Canani · Samy Hadjadj · Michel Marre · Maria Lúcia Corrêa-Giannella · Gilberto Velho

Received: 17 June 2013 / Accepted: 2 September 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

### Abstract

**Aims/hypothesis** Oxidative stress is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. The antioxidant enzyme catalase plays a key role in redox regulation in the kidney. We investigated associations of catalase gene (*CAT*) polymorphisms and plasma catalase activity with diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients.

**Methods** We genotyped nine single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CAT* region in participants from the Survival Genetic Nephropathy (SURGENE) (340 French participants, 10 year follow-up) and the Génétique de la Néphropathie Diabétique (GENEDIAB) (444 Belgian and French participants, 8 year follow-up) study cohorts. Replication was performed in a Brazilian cross-sectional cohort

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00125-013-3057-z) contains peer-reviewed but unedited supplementary material, which is available to authorised users.

K. Mohammadi · T. A. Patente · N. Bellili-Muñoz · F. Fumeron · M. Marre · G. Velho (✉)  
Inserm Research Unit 695, 16 rue Henri Huchard,  
75018 Paris, France  
e-mail: gilberto.velho@inserm.fr

K. Mohammadi · R. Roussel · M. Marre  
Department of Diabetology, Endocrinology and Nutrition,  
Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Bichat Hospital,  
Paris, France

T. A. Patente · M. B. Monteiro · M. L. Corrêa-Giannella  
Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM-25),  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP),  
São Paulo, Brazil

F. Driss  
Inserm Research Unit 773, Paris, France

F. Driss · N. Seta  
Department of Biochemistry, Assistance Publique Hôpitaux de Paris,  
Bichat Hospital, Paris, France

R. Roussel · F. Fumeron · M. Marre  
UFR de Médecine, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité,  
Paris, France

R. Roussel  
Inserm Research Unit 872, Paris, France

E. J. Pavin  
Divisão de Endocrinologia, Departamento de Clínica Médica,  
Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Campinas  
(UNICAMP), Campinas, Brazil

N. Seta  
UFR de Pharmacie, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité,  
Paris, France

M. J. Azevedo · L. H. Canani  
Divisão de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

S. Hadjadj  
Department of Endocrinology and Diabetology, Centre Hospitalier  
Universitaire de Poitiers, Poitiers, France

S. Hadjadj  
Inserm Research Unit 1082, Poitiers, France

S. Hadjadj  
Inserm CIC 0802, Poitiers, France

S. Hadjadj  
UFR de Médecine et Pharmacie, Université de Poitiers,  
Poitiers, France

Published online: 21 September 2013

 Springer



( $n=451$ ). Baseline plasma catalase activity was measured in SURGENE ( $n=120$ ) and GENEDIAB ( $n=391$ ) participants. **Results** The A allele of rs7947841 was associated with the prevalence of incipient (OR 2.79, 95% CI 1.21, 6.24,  $p=0.01$ ) and established or advanced nephropathy (OR 5.72, 95% CI 1.62, 22.03,  $p=0.007$ ), and with the incidence of renal events, which were defined as new cases of microalbuminuria or progression to a more severe stage of nephropathy during follow-up (HR 1.82, 95% CI 1.13, 2.81,  $p=0.01$ ) in SURGENE participants. The same risk allele was associated with incipient nephropathy (OR 3.13, 95% CI 1.42, 7.24,  $p=0.004$ ) and with the incidence of end-stage renal disease (ESRD) (HR 2.11, 95% CI 1.23, 3.60,  $p=0.008$ ) in GENEDIAB participants. In both cohorts, the risk allele was associated with lower catalase activity. Associations with incipient and established or advanced nephropathy were confirmed in the replication cohort.

**Conclusions/interpretation** *CAT* variants were associated with the prevalence and incidence of diabetic nephropathy and ESRD in type 1 diabetic patients. Our results confirm the protective role of catalase against oxidative stress in the kidney.

**Keywords** Catalase · Diabetic nephropathy · End-stage renal disease · Oxidative stress

#### Abbreviations

ANCOVA	Analysis of covariance
eGFR	Estimated GFR
ESRD	End-stage renal disease
GENEDIAB	Génétique de la Néphropathie Diabétique (study)
HSD	Honestly significant difference
ROS	Reactive oxygen species
SNP	Single nucleotide polymorphism
SURGENE	Survival Genetic Nephropathy (study)
UAE	Urinary albumin excretion

#### Introduction

Vascular complications, particularly diabetic nephropathy, account for most of the reduced life expectancy of patients with type 1 diabetes [1, 2]. Diabetic nephropathy is the leading cause of kidney failure and end-stage renal disease (ESRD) [1], and is associated with an increased risk of all-cause and cardiovascular mortality [2]. Although it is clear that poor blood glucose control is the major determinant of microvascular complications in people with type 1 diabetes [3, 4], individual susceptibility to diabetic nephropathy is modulated by genetic factors [5–7].

Hyperglycaemia causes oxidative stress. It leads to overproduction of reactive oxygen species (ROS) from a variety of sources and to the depletion of many cellular antioxidants [8–11]. Oxidative damage to lipids, proteins and DNA leads to changes in cellular structure and function. ROS also act as second messengers and affect the regulation of intracellular signalling and gene expression [11]. It is now well established that oxidative stress plays a central role in the development of diabetic nephropathy [9, 10, 12–14].

Oxidative stress results from the imbalance between the production of ROS and the cell detoxification capacity. Antioxidant enzymes such as catalase are the first line of defence against oxidative stress [15]. Catalase is a ubiquitous enzyme found in nearly all aerobic organisms. It is mainly located in cellular peroxisomes, and is most abundant in the liver, kidneys and erythrocytes [15, 16]. Catalase mediates the reduction of hydrogen peroxide to water and oxygen, and plays a significant role in the development of tolerance to oxidative stress. Hydrogen peroxide can react with metals, such as  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ , to form hydroxyl radical ( $\cdot\text{HO}$ ), the most reactive of all ROS. This reaction is a major source of ROS in hyperglycaemic states [11], and studies in rodents suggest that catalase plays a key role in redox regulation in the kidney during hyperglycaemia [17–20].

Catalase activity in erythrocytes has been shown to be modulated by a polymorphism in the *CAT* promoter [21]. In the present investigation, we assessed the associations of plasma catalase activity and a set of *CAT* tag single nucleotide polymorphisms (SNPs) with diabetic nephropathy in two prospective cohorts of French and Belgian patients with type 1 diabetes. Replication was performed in a Brazilian cross-sectional cohort.

#### Methods

**Participants** We studied three cohorts designed to evaluate the genetic components of diabetic nephropathy. The Survival Genetic Nephropathy (SURGENE) study was a prospective study conducted in 340 people with type 1 diabetes, who were recruited in the outpatient clinic of the University Hospital of Angers, France [22]. At baseline, 60 individuals (17.6%) had a diagnosis of incipient, established or advanced diabetic nephropathy (see below). The prevalence of non-proliferative, pre-proliferative or proliferative retinopathy at baseline was 15%, 13% and 11%, respectively. Mean duration of follow-up was  $10\pm 3$  years. New cases of incipient nephropathy (persistent microalbuminuria in consecutive biannual assessments) during follow-up were observed in 76 of the 280 normoalbuminuric individuals at baseline (27.1%). A renal event, defined as a new case of microalbuminuria or progression to a more severe stage of nephropathy, was observed in 98 participants (28.8%).

The Génétique de la Néphropathie Diabétique (GENEDIAB) study was a multi-centre, binational (Belgium and France) study, conducted in 444 patients with type 1 diabetes and a diagnosis of pre-proliferative (19%) or proliferative diabetic retinopathy (81% of cases) [5]. Incipient, established or advanced diabetic nephropathy was present in 310 individuals (69.8%) at baseline. In a prospective observational study, 315 participants were followed until an endpoint was reached or until February 2007. The mean duration of follow-up was  $8.6 \pm 3.1$  years and the incidence of new cases of ESRD was 10.5% (13 people began treatment by haemodialysis and 20 people underwent kidney transplantation).

The replication of genetic results was performed in a cross-sectional Brazilian cohort [23] recruited in diabetes or endocrinology departments of three university hospitals in the cities of São Paulo, Campinas and Porto Alegre, Brazil. The cohort comprised 451 people who had had type 1 diabetes for more than 10 years. Estimated GFR (eGFR)  $< 60$  ml/min in the absence of diabetic retinopathy was an exclusion criteria. Incipient, established or advanced diabetic nephropathy was present in 201 individuals (44.6%). Participants, individually and as a group, had mixed ethnic backgrounds (predominantly European of several different countries of origin and African) that reflected the Brazilian population [24].

All participants gave written informed consent. SURGENE and GENEDIAB study protocols were approved by the Ethics Committee of Angers University Hospital, Angers, France. Protocols of the replication cohort were approved by the Ethics Committee of the University of São Paulo School of Medicine (FMUSP), São Paulo, Brazil.

**Diabetic nephropathy and retinopathy stages** Stages of nephropathy were defined as follows: (1) no nephropathy, defined as urinary albumin excretion (UAE)  $< 30$  mg/24 h or  $< 20$   $\mu$ g/min or  $< 20$  mg/l and plasma creatinine  $< 150$   $\mu$ mol/l in at least two of three consecutive assessments and in the absence of antihypertensive treatment; (2) incipient nephropathy, defined as persistent microalbuminuria (UAE 30–300 mg/24 h or 20–200  $\mu$ g/min or 20–200 mg/l) and plasma creatinine  $< 150$   $\mu$ mol/l in at least two of three consecutive assessments; (3) established nephropathy, defined as past or present macroalbuminuria (UAE  $> 300$  mg/24 h or  $> 200$   $\mu$ g/min or  $> 200$  mg/l) and plasma creatinine  $< 150$   $\mu$ mol/l; and (4) advanced nephropathy, defined as past or present macroalbuminuria and plasma creatinine  $> 150$   $\mu$ mol/l or renal replacement therapy. GFR was estimated using the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) formula [25]. Retinopathy was staged according to Kohner's classification [26].

**Catalase activity and DNA studies** Catalase activity was measured in a subset of participants from the SURGENE ( $n = 120$ ) and GENEDIAB ( $n = 391$ ) studies for whom fasting plasma

EDTA samples were available. Samples were collected at baseline and kept frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . A colorimetric/fluorometric assay kit was used (EnzyChrom ECAT-100; BioAssay Systems, Hayward, CA, USA). In the SURGENE and GENEDIAB studies, nine SNPs (rs1001179, rs2300182, rs11032703, rs2300181, rs10488736, rs2420388, rs566979, rs7947841 and rs499406) in the *CAT* region (chromosome 11p13) were analysed. Locations of SNPs and linkage disequilibrium between SNPs are shown in the electronic supplementary material (ESM) Table 1. SNPs were chosen in HapMap (public release 23) on the basis of providing information on  $\sim 81\%$  of the allelic variation of SNPs with a minor allele frequency  $> 5\%$  at  $r^2 > 0.8$  in haplotype blocks containing *CAT*. Genotypes were determined by competitive allele-specific PCR genotyping system assays (KASP; LGC Genomics, Hoddeston, UK). Genotypes of rs7947841 in the replication cohort were determined by TaqMan SNP Assay (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The genotyping success rate was  $> 95\%$ . Genotyping was repeated in 5% of participants with 100% concordance. All genotypes were in Hardy–Weinberg equilibrium.

**Statistical analysis** Results are expressed as mean  $\pm$  SD except where stated otherwise. Differences between groups were assessed by Pearson's  $\chi^2$  test, Fisher's exact test, Wilcoxon's test, the Kruskal–Wallis test, ANOVA and ANCOVA. When ANOVA or ANCOVA were significant, comparisons between pairs were made using the Tukey–Kramer honestly significant difference (HSD) test. Associations with nephropathy were assessed by regression models. Cox proportional hazards survival regression analyses were used to examine the effect of genotypes on time-related survival (outcome-free) rates in prospective analyses. Logistic regression analyses were used for cross-sectional analyses. HRs or ORs with 95% CIs were computed for the minor allele in a co-dominant model unless otherwise stated. To increase power, individuals with established or advanced nephropathy were pooled for genetic analyses. To take into account the differences in diabetic retinopathy status resulting from different inclusion criteria in different cohorts, and because of a possible *CAT* genotype confounding effect on retinopathy, comparisons of diabetic nephropathy by genotype included adjustment for retinopathy stages. Data were log-transformed (base  $e$ ) for the analyses when the normality of the distribution was rejected by the Shapiro–Wilk  $W$ -test. Correction for multiple comparisons due to multiple SNP testing took into account the effective number of independent tests ( $M_{\text{eff}}$ ) based on the degree of linkage disequilibrium between SNPs [27]. A value of  $p \leq 0.02$  was considered significant, unless stated otherwise. The power to detect associations of the SNPs with (1) the prevalence of established or advanced nephropathy at baseline, and the incidence of renal events during follow-up in the SURGENE cohort, and (2) with the prevalence of established or advanced

nephropathy at baseline, and the incidence of ESRD in the GENEDIAB cohort was 0.51 and 0.75, and 0.90 and 0.82, respectively, for an OR or HR  $\geq 1.5$  and  $\alpha=0.05$ . The power to detect a 20–25% variation of catalase activity was ~70%. Statistics were performed with JMP software (SAS Institute, Cary, NC, USA).

## Results

**SURGENE cohort** The prevalence of incipient, established and advanced diabetic nephropathy at baseline was 10.6%, 5.3% and 1.7%, respectively. The clinical characteristics of participants by nephropathy stages at baseline have been published previously [7]. Briefly, individuals with established or advanced nephropathy compared with those with normal UAE were older, had a longer duration of diabetes, higher blood pressure levels and decreased renal function, and were more likely to be taking ACE inhibitors and antihypertensive medication; individuals with incipient nephropathy presented with intermediate values for these variables. Diabetic retinopathy increased in frequency and severity with the severity of diabetic nephropathy. Genotype frequencies by nephropathy stages at baseline are shown in ESM Table 2. We observed associations between the A allele of rs7947841 and the prevalence of incipient (OR 2.79, 95% CI 1.21, 6.24,  $p=0.01$ ) and established or advanced nephropathy (OR 5.72, 95% CI 1.62, 22.03,  $p=0.007$ ). These results are in keeping with the genotype-related prevalence of incipient nephropathy (GG 8.3% vs AA+AG 15.4%) and established or advanced nephropathy (GG 5.4% vs AA+AG 10.8%). The A allele of rs7947841 was also associated with diabetic retinopathy at baseline, but the association did not remain significant when adjusted for nephropathy stages (data not shown). An association with incipient nephropathy was also observed for the A allele of rs1001179 (OR 1.79, 95% CI 1.17, 2.79,  $p=0.008$ ).

The incidence of renal events (new cases of microalbuminuria or progression to a more severe stage of nephropathy, including ESRD) during follow-up was 28.8%. The characteristics of participants at baseline according to the incidence of renal events during follow-up are shown in Table 1. Compared with participants with stable renal status during follow-up, individuals who had a renal event had higher HbA<sub>1c</sub> and blood pressure levels at baseline, and were more likely to be taking ACE inhibitors and antihypertensive medication. Patients who developed ESRD also had a longer duration of diabetes and decreased renal function. Retinopathy was more frequent and severe in individuals who had a renal event. Genotype frequencies by renal events during follow-up are shown in Table 2. The incidence of renal events by rs7947841 genotype was 25.0% (GG) vs 35.4% (AA+AG). An association between the A allele of rs7947841 and the incidence of renal events was confirmed by Cox proportional hazards

survival regression analyses (Table 2, Fig. 1a). A nominal association ( $p>0.02$  to  $p\leq 0.05$ ) was also observed when considering only new cases of persistent microalbuminuria during follow-up among participants with normoalbuminuria at baseline (HR 1.88, 95% CI 1.04–3.22,  $p=0.03$ ).

**GENEDIAB cohort** The prevalence of incipient, established and advanced diabetic nephropathy at baseline was 21.6%, 22.1% and 26.1%, respectively. The clinical characteristics of participants with or without nephropathy have been published previously [7]. Briefly, individuals with established or advanced nephropathy compared with those with normal UAE had higher blood pressure levels and decreased renal function, and were more likely to be taking ACE inhibitors and antihypertensive medication. Genotype frequencies by nephropathy stages at baseline are shown in ESM Table 3. We observed an association between the A allele of rs7947841 and the prevalence of incipient nephropathy (OR 3.13, 95% CI 1.42, 7.24,  $p=0.004$ ). These results are in keeping with the genotype-related prevalence of incipient nephropathy (GG 19.3% vs AA+AG 27.7%). A nominal association with established or advanced nephropathy was observed for the A allele of rs7947841 (OR 2.14, 95% CI 1.00, 4.79,  $p=0.05$ ). Associations with the trait were also observed for rs1001179, rs10488736 and rs566979 ( $p=0.02$ ). Severe retinopathy was an inclusion criterion for GENEDIAB, and thus allelic associations with diabetic retinopathy were not assessed.

The incidence of ESRD during follow-up was 10.5%. Clinical characteristics of participants at baseline according to ESRD status during follow-up are shown in Table 1. Compared with patients without ESRD, new cases of ESRD were younger, had shorter duration of diabetes and higher levels of HbA<sub>1c</sub>, blood pressure and UAE, as well as decreased renal function, and were also more likely to be taking antihypertensive treatment. Genotype frequencies by ESRD status during follow-up are shown in Table 2. Cox proportional hazards survival regression analyses showed associations of the A allele of rs7947841 (Fig. 1b) and the T allele of rs2420388 with the incidence of ESRD. These results are in keeping with the genotype-related ESRD incidence, i.e. 11.3% (GG) vs 18.0% (AA+AG) for rs7947841, and 10.6% (CC) vs 16.2% (TC+TT) for rs2420388.

**Replication study in the Brazilian cohort** The clinical characteristics of participants from the Brazilian cohort have been published previously [23] and are shown in ESM Table 4. The prevalence of incipient, established and advanced diabetic nephropathy was 18.2%, 12.6% and 13.9%, respectively. Genotype frequencies by nephropathy stages are shown in ESM Table 5. We confirmed the association between the A allele of rs7947841 and incipient (OR 2.16, 95% CI 1.14, 4.10,  $p=0.02$ ) and established or advanced

## Diabetologia

**Table 1** Characteristics of participants at baseline by incidence of renal events (SURGENE) or ESRD (GENEDIAB) during follow-up

Variable	SURGENE incidence of renal events				GENEDIAB incidence of ESRD		
	No	Yes	Yes (ESRD)	<i>p</i> value	No	Yes	<i>p</i> value
<i>n</i>	242	91	7		282	33	
Age (years)	33±13	34±14	40±7	0.21	46±12	41±11	0.02
Sex				0.25			0.79
Men (%)	46	36	43		60	58	
Women (%)	54	64	57		40	42	
Age at diabetes onset (years)	19±10	19±10	15±7	0.58	16±9	16±9	0.81
Duration of diabetes (years)	14±11	16±11	25±7 <sup>a,b</sup>	0.008	30±9	25±10	0.003
HbA <sub>1c</sub>				0.03			0.04
In %	9.2±2.3	9.8±2.3 <sup>a</sup>	9.1±2.5		8.6±1.7	9.4±1.9	
In mmol/mol	77±25	84±25	76±27		71±11	79±13	
Systolic BP (mmHg)	124±14	131±17 <sup>a</sup>	160±9 <sup>a,b</sup>	<0.0001	139±18	152±17	0.0005
Diastolic BP (mmHg)	72±10	74±11 <sup>a</sup>	91±7 <sup>a,b</sup>	<0.0001	78±11	91±11	<0.0001
Plasma creatinine (μmol/l)	79±20	82±18	165±54 <sup>a,b</sup>	<0.0001	115±104	193±126	<0.0001
eGFR (ml min <sup>-1</sup> 1.73 m <sup>-2</sup> )	98±23	95±23	42±15 <sup>a,b</sup>	<0.0001	77±32	42±20	<0.0001
UAE (mg/l)	7 (3–12)	10 (5–16)	926 (360–1920)	0.0005	21 (2–844)	1093 (9–3968)	<0.0001
ACE inhibitor treatment (%)	6	11	71	<0.0001	46	55	0.32
Antihypertensive treatment (%)	8	18	86	<0.0001	56	86	0.002
Diabetic retinopathy stages				<0.0001			0.95
Absence (%)	67	52	0		0	0	
Non-proliferative (%)	14	20	0		0	0	
Pre-proliferative (%)	12	15	14		14	14	
Proliferative (%)	7	13	86		86	86	
Macrovascular complications (%) <sup>c</sup>	1.2	4.4	14.3	0.03	9.1	10.3	0.73

Results are expressed as means±SD, except UAE, which is expressed as median (interquartile range)

Renal events were defined as new cases of microalbuminuria or progression to a more severe stage of nephropathy; ESRD was defined as treatment by haemodialysis or kidney transplantation

Statistics of quantitative variables are by ANOVA performed with log-transformed data or by Wilcoxon's test (UAE); significance defined as  $p < 0.05$

<sup>a</sup> Significantly different from No renal events by Tukey–Kramer HSD test following ANOVA

<sup>b</sup> Significantly different from Yes renal events by Tukey–Kramer HSD test following ANOVA

<sup>c</sup> Macrovascular complications: previous myocardial infarction, coronary or carotid revascularisation, stroke or peripheral artery disease

nephropathy (OR 2.71, 95% CI 1.38, 5.42,  $p = 0.004$ ) in the replication cohort.

**Plasma catalase activity, diabetic nephropathy and CAT genotypes** In SURGENE participants, plasma catalase activity was significantly and positively correlated with age ( $R^2 = 0.10$ ,  $p = 0.0002$ ), BMI ( $R^2 = 0.03$ ,  $p = 0.02$ ), duration of diabetes ( $R^2 = 0.08$ ,  $p = 0.002$ ), systolic blood pressure ( $R^2 = 0.06$ ,  $p = 0.005$ ), diastolic blood pressure ( $R^2 = 0.07$ ,  $p = 0.005$ ) and UAE ( $R^2 = 0.16$ ,  $p < 0.0001$ ); it was inversely correlated with eGFR ( $R^2 = 0.04$ ,  $p = 0.03$ ). No correlation with HbA<sub>1c</sub> or sex-related differences were observed. In a stepwise regression analysis, only correlations with age and UAE remained significant (data not shown). No correlations with these clinical variables were observed in the GENEDIAB cohort. However, catalase activity was significantly lower in patients using ACE

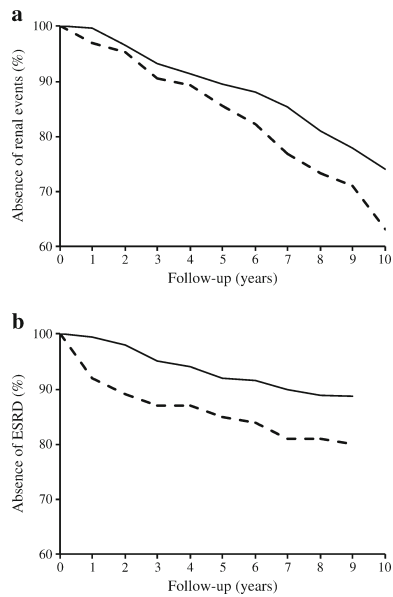
inhibitors than in those who were not ( $10.0 \pm 0.2$  [ $n = 145$ ] vs  $12.3 \pm 0.2$  [ $n = 246$ ],  $p < 0.0001$ ). Catalase activity was higher in patients with a history of macrovascular complications (myocardial infarction, stroke or coronary and/or carotid revascularisation) than in those without ( $12.6 \pm 0.5$  [ $n = 41$ ] vs  $11.4 \pm 0.3$  [ $n = 350$ ],  $p = 0.02$ ). When adjusted for the use of ACE inhibitors and macrovascular status, catalase activity was positively correlated with systolic ( $R^2 = 0.01$ ,  $p = 0.04$ ) and diastolic blood pressure ( $R^2 = 0.01$ ,  $p = 0.03$ ). The clinical characteristics of SURGENE and GENEDIAB participants by tertiles of plasma catalase activity reflect the correlations observed in each cohort (ESM Table 6).

Plasma catalase activity was significantly higher in GENEDIAB than in SURGENE participants ( $11.3 \pm 0.2$  vs  $7.4 \pm 0.4$  U/l, mean ± SEM,  $p < 0.0001$ , adjusted for sex, age and diabetic nephropathy stages). In SURGENE participants,

**Table 2** Genotype and allele frequencies by incidence of renal events or ESRD during follow-up

Variable	SURGENE incidence of renal events				GENEDIAB incidence of ESRD			
	No 242	Yes 98	HR (95% CI)	<i>p</i> value	No 282	Yes 33	HR (95% CI)	<i>p</i> value
<i>n</i>								
rs1001179								
GG	0.608	0.660	0.91 (0.62, 1.30)	0.59	0.633	0.571	1.19 (0.50, 1.56)	0.55
GA	0.338	0.268			0.283	0.357		
AA	0.054	0.072			0.084	0.072		
MAF	0.223	0.206			0.226	0.251		
rs2300182								
AA	0.716	0.781	0.77 (0.46, 1.21)	0.27	0.773	0.760	2.27 (0.83, 5.38)	0.10
AT	0.257	0.208			0.199	0.200		
TT	0.027	0.011			0.028	0.040		
MAF	0.156	0.115			0.128	0.140		
rs11032703								
CC	0.792	0.670	1.29 (0.76, 2.07)	0.34	0.789	0.840	0.74 (0.25, 1.76)	0.54
CT	0.199	0.320			0.189	0.120		
TT	0.009	0.010			0.022	0.040		
MAF	0.109	0.170			0.117	0.100		
rs2300181								
GG	0.495	0.546	0.97 (0.65, 1.42)	0.88	0.534	0.360	1.11 (0.60, 2.15)	0.75
GA	0.427	0.386			0.351	0.640		
AA	0.078	0.068			0.115	0		
MAF	0.292	0.261			0.291	0.320		
rs10488736								
CC	0.486	0.505	0.92 (0.64, 1.82)	0.66	0.456	0.320	1.16 (0.64, 2.14)	0.63
CT	0.412	0.429			0.368	0.600		
TT	0.102	0.066			0.176	0.080		
MAF	0.308	0.281			0.360	0.380		
rs2420388								
CC	0.574	0.531	1.29 (0.90, 1.81)	0.17	0.640	0.520	2.80 (1.31, 5.98)	0.009
CT	0.356	0.408			0.273	0.400		
TT	0.070	0.061			0.087	0.080		
MAF	0.248	0.265			0.224	0.280		
rs566979								
TT	0.406	0.448	0.91 (0.65, 1.27)	0.60	0.404	0.393	0.73 (0.39, 1.29)	0.27
TG	0.441	0.437			0.388	0.536		
GG	0.153	0.115			0.208	0.071		
MAF	0.374	0.334			0.402	0.339		
rs7947841								
GG	0.812	0.725	1.82 (1.13, 2.81)	0.01	0.816	0.720	2.11 (1.23, 3.60)	0.008
GA	0.179	0.255			0.178	0.280		
AA	0.009	0.020			0.006	0		
MAF	0.099	0.148			0.095	0.140		
rs499406								
GG	0.433	0.330	1.06 (0.76, 1.49)	0.72	0.451	0.440	0.55 (0.26, 1.07)	0.08
GA	0.392	0.546			0.358	0.480		
AA	0.175	0.124			0.191	0.080		
MAF	0.371	0.397			0.370	0.320		

SNPs are sorted in 5' to 3' order  
HRs for the minor allele in a co-dominant model, adjusted for sex, age, duration of diabetes, HbA<sub>1c</sub>, antihypertensive treatment, use of ACE inhibitors (GENEDIAB) and retinopathy stages  
Renal events and ESRD defined as in Table 1  
Retinopathy was coded as an ordinal polytomous variable: absent (1), non-proliferative (2), pre-proliferative (3) or proliferative retinopathy (4)  
Significance was defined as  $p \leq 0.02$   
MAF, minor allele frequency



**Fig. 1** Kaplan–Meier survival (disease-free) curves during follow-up by rs7947841 genotypes. (a) Renal events defined as new cases of microalbuminuria or progression to a more severe stage of nephropathy in SURGENE participants. GG  $n=276$ , GA  $n=61$  and AA  $n=3$ . (b) ESRD, i.e. new cases of treatment by haemodialysis or kidney transplantation, in GENEDIAB participants. GG  $n=249$ , GA  $n=63$  and AA  $n=3$ . Continuous lines, GG; dashed lines, GA/AA

catalase activity was higher in patients with diabetic nephropathy than in patients without nephropathy at baseline ( $12.9 \pm 1.2$  [ $n=12$ ] vs  $6.0 \pm 0.4$  U/l [ $n=108$ ],  $p < 0.0001$ ). It was also higher in participants who had a renal event during follow-up than in those who did not ( $8.3 \pm 0.8$  [ $n=36$ ] vs  $6.1 \pm 0.5$  U/l [ $n=84$ ],  $p=0.02$ ). With regard to nephropathy status at the end of follow-up, patients with nephropathy already had higher plasma catalase activity at baseline than patients without nephropathy ( $8.4 \pm 0.9$  [ $n=44$ ] vs  $6.3 \pm 0.5$  U/l [ $n=76$ ],  $p=0.03$  [all SURGENE comparisons adjusted for sex and age]). Plasma catalase activity by nephropathy status at baseline in the GENEDIAB cohort was  $11.6 \pm 0.3$  (without nephropathy;  $n=135$ ),  $11.6 \pm 0.4$  (incipient nephropathy;  $n=84$ ) and  $11.3 \pm 0.3$  U/l (established or advanced nephropathy;  $n=172$ ) ( $p=0.59$ , adjusted for sex and age). Higher catalase activity was observed in participants with nephropathy when the comparison was further adjusted for use of ACE inhibitors and macrovascular status, i.e.  $10.9 \pm 0.4$  vs  $11.9 \pm 0.4$  vs  $11.9 \pm 0.3$  U/l ( $p=0.02$ ), respectively. A trend towards higher activity was observed in patients who developed ESRD during follow-up ( $13.2 \pm 0.9$  [ $n=25$ ] vs  $12.0 \pm 0.6$  U/l [ $n=172$ ],  $p=0.06$ ).

Plasma catalase activity by rs7947841 genotype is shown in Table 3. As catalase activity was available only for a small subset of SURGENE participants with nephropathy at baseline, we considered the diabetic nephropathy status at the end of follow-up for these analyses in the SURGENE cohort. In both cohorts, nephropathy patients who were carriers of the risk A allele of rs7947841 had lower catalase activity than GG carriers. This genotype-related effect was not observed in participants without nephropathy. In both cohorts, catalase activity in GG, but not in GA/AA carriers was higher in patients with diabetic nephropathy than in patients without nephropathy.

## Discussion

We observed associations between *CAT* variants and diabetic nephropathy in three cohorts of people with type 1 diabetes. The minor A allele of rs7947841 was associated with the prevalence of incipient and established or advanced nephropathy in Belgian and French individuals of European descent from the SURGENE and GENEDIAB cohorts, as well as in Brazilian individuals of mixed ethnic background. The same allele was associated during follow-up with the progression of diabetic nephropathy in SURGENE and the incidence of ESRD in GENEDIAB participants. Other allelic associations were also observed, notably between the minor T allele of rs2420388 and the incidence of ESRD in the GENEDIAB

**Table 3** Plasma catalase activity at baseline by rs7947841 genotype and diabetic nephropathy status

Variable	GG	GA/AA	<i>p</i> value
<b>SURGENE</b>			
No nephropathy	$6.2 \pm 1.1$	$6.0 \pm 0.8$	0.72
<i>n</i>	55	21	
Nephropathy (all stages)	$9.1 \pm 1.1$	$5.9 \pm 1.8$	0.04
<i>n</i>	29	15	
<i>p</i> value	0.05	0.72	
<b>GENEDIAB</b>			
No nephropathy	$10.9 \pm 0.9$	$11.3 \pm 1.1$	0.54
<i>n</i>	112	23	
Nephropathy (all stages)	$12.0 \pm 0.3$	$10.6 \pm 0.5$	<0.05
<i>n</i>	203	53	
<i>p</i> value	0.02	0.63	

Results are expressed as means  $\pm$  SEM

Statistics are by ANCOVA, adjusted for sex and age (SURGENE), or for sex, age, use of ACE inhibitors and history of macrovascular complications (GENEDIAB)

Diabetic nephropathy status is according to baseline data for GENEDIAB and follow-up data for SURGENE

$p < 0.05$  was significant

cohort. No independent allelic association with diabetic retinopathy was observed.

The assessment of plasma catalase activity yielded unexpected and contrasting results. Paradoxically, catalase activity was higher in participants with diabetic nephropathy than in those without. Studies in rodents suggest that catalase activity is upregulated during oxidative stress [28] and plays a significant role in the development of tolerance to oxidative stress [11, 15, 19]. Thus, the higher levels of catalase activity in patients with nephropathy might result from an adaptive response to oxidative stress. In this regard, our results are in keeping with a study of *CAT* mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells [29]. When, in that study, cells were exposed in vitro to 11 mmol/l glucose, a condition similar to the fasting plasma glucose levels observed at baseline in our cohorts (10–12 mmol/l on average), higher expression levels were observed in cells from type 1 diabetic patients with nephropathy than in those from patients without microvascular complications and from non-diabetic controls. Interestingly, *CAT* mRNA expression was lower in cells from patients with diabetic nephropathy when cells were exposed to a much higher (31 mmol/l) glucose concentration, which probably induced cellular dehydration and other toxic effects.

Catalase activity was on average 35% higher in GENEDIAB than in SURGENE participants. A correlation of catalase activity with diabetic nephropathy was observed in GENEDIAB only following adjustment for the use of ACE inhibitors. These inter-cohort differences in catalase activity might be related to differences in the clinical profiles of the cohorts, which may have acted as confounding factors. Participants from the GENEDIAB study were older, had a longer duration of diabetes and were more severely ill. Diabetic nephropathy, but also diabetic retinopathy, arterial hypertension and macrovascular complications were more frequent and/or more severe in GENEDIAB participants. It is now clear that these comorbidities are also associated with oxidative stress [30–32]. In this regard, we observed higher plasma catalase levels in GENEDIAB participants who had a previous history of macrovascular complications than in those who did not, as well as a positive correlation with blood pressure. Moreover, the use of ACE inhibitors was associated with a ~20% decrease in plasma catalase activity and was thus the major determinant of plasma catalase activity identified by us in the GENEDIAB cohort. We do not have a clear explanation for this effect. Experimental evidence suggests that ACE inhibitors decrease oxidative stress [33–36]. They might therefore also lessen the increase in catalase activity in response to oxidative stress. Despite this inter-cohort heterogeneity, in both cohorts the risk A allele of rs7947841 was associated with lower catalase activity in patients with nephropathy. Because of its observational nature, our study cannot confirm any pathophysiological mechanisms, but it can be speculated that the risk A allele is associated with a less efficient adaptive response to oxidative

stress. A comparison of catalase activity by nephropathy status in carriers of different rs7947841 genotypes (Table 3) offers an insight into this hypothesis, with higher catalase activity in participants with nephropathy being observed in carriers of the GG genotype, but not among A allele carriers.

Our study has some limitations, notably in connection with issues related to catalase activity measurement. Thus, enzymatic activity was assayed in plasma EDTA samples collected at baseline and kept frozen for ~20 years. Moreover, samples were available only for a subset of participants. Finally, catalase is mostly an intracellular enzyme. However, we only measured plasma catalase activity, and it is unclear how well this reflects intracellular enzyme activity. The above issues might have affected, at least in part, our comparisons of catalase activity between groups. Another limitation is the relatively small sample size of our cohorts and the small number of events during follow-up. The statistical power was adequate to detect SNP effects with a HR  $\geq 1.5$ , but might have been insufficient to detect effects of a smaller magnitude. However, it is unlikely that our findings only reflect type 1 errors (false positive results) due to population stratification. The association of the A allele of rs7947841 with the prevalence of nephropathy was observed in three independent cohorts, including an ethnically diverse Brazilian cohort. This variant has similar minor allele frequencies in European and sub-Saharan African individuals (Database of Single Nucleotide Polymorphisms [dbSNP], accessed in January 2013), and so it is unlikely that the association observed in the replication cohort was due to population stratification. The same risk allele was associated with incidence and progression of diabetic nephropathy, and with the incidence of ESRD during 8 and 10 years of follow-up in two independent cohorts. A type 1 error due to population stratification is less likely to occur in a prospective study that is much less prone to selection bias than in case-control studies. Moreover, the argument that these associations are solely due to population stratification is mitigated by previous results in families with type 1 diabetes (see below) [37].

As far as we know, this is the first study to investigate associations of catalase activity and a set of *CAT* tagSNPs with kidney disease in type 1 diabetic patients during a long-term follow-up. No association of the *CAT* region with kidney function and chronic kidney disease in type 1 diabetic patients was observed in recent GWAS [38, 39]. However, our findings are in agreement with results from a family-based study by Ewens and co-workers, who tested 115 candidate genes for linkage and association with nephropathy in 72 type 1 diabetic families of European descent [37]. In a transmission/disequilibrium test the investigators observed associations of *CAT* rs1049982 and rs560807 with nephropathy, defined as ESRD or an albumin:creatinine ratio  $>300$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  (3.4 mg/mmol). One of these variants (rs560807) is in complete linkage disequilibrium with rs7947841, which was associated with nephropathy in our study. The molecular mechanisms underlying the associations of

*CAT* variants with nephropathy are unclear. All but one of the variants we tested are located outside coding or known regulatory regions. The rs1001179 (-262C>T) SNP is located in the promoter region and has been reported to modulate the binding of transcription factors and *CAT* expression in human hepatocellular carcinoma (HepG2) and leukaemia-derived (K562) cell lines [21]. However, contrasting results have been observed regarding its effect on catalase activity [21, 40–42]. We observed an association of rs1001179 only with incipient nephropathy at baseline in SURGENE participants. We did not observe an association between the variant and catalase activity.

Overproduction of ROS induced by hyperglycaemia is an early molecular mechanism in the pathogenesis of diabetic kidney complications [9, 10]. Oxidative stress plays a key role in the development of diabetic nephropathy [9, 10, 12–14]. The protective role of catalase is supported by studies in animal models. Thus overexpression of catalase in double transgenic mice overexpressing angiotensinogen decreased ROS generation in the kidney and prevented hypertension, albuminuria, tubulointerstitial fibrosis and tubular apoptosis [43]. Moreover, overexpression of catalase in mouse models of type 1 or type 2 diabetes markedly decreased hyperglycaemia-induced ROS generation in the kidney [17, 18, 20], attenuated glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, proapoptotic gene expression and tubular apoptosis [17, 18], and prevented hypertension and the progression of nephropathy [20]. Consistent with these observations, catalase deficiency increased ROS production and accelerated diabetic renal injury [19].

In conclusion, we have observed associations between *CAT* allelic variations and the prevalence and incidence of diabetic nephropathy and ESRD in patients with type 1 diabetes. The A allele of rs7947841, which was consistently associated with less favourable kidney phenotypes in three distinct cohorts, was also associated with lower plasma catalase activity. Our results confirm the role of catalase in the mechanisms of renal protection against oxidative stress. Further studies are needed to identify the functional variants of *CAT* that modulate its allelic effects on diabetic nephropathy.

**Funding** This work was supported by grants from Association Diabète Risque Vasculaire (ADRV) and from Association L'Aide Aux Jeunes Diabétiques (AJD), France. TAP was supported by grant no. 11/15015-8 from the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), Brazil.

**Duality of interest** The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

**Contribution statement** KM and GV contributed to the conception and design of the study, researched data (acquisition, analysis, interpretation) and wrote the manuscript. RR, FF, SH, MJA, MM and MLC-G contributed to the conception and design of the study, and reviewed/edited the manuscript. TAP, NB-M, FD, NS, MBM, EJP and LHC researched data (acquisition, analysis, interpretation) and reviewed/edited the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

## References

- Jones CA, Krolewski AS, Rogus J, Xue JL, Collins A, Warram JH (2005) Epidemic of end-stage renal disease in people with diabetes in the United States population: do we know the cause? *Kidney Int* 67: 1684–1691
- Orchard TJ, Secrest AM, Miller RG, Costacou T (2010) In the absence of renal disease, 20 year mortality risk in type 1 diabetes is comparable to that of the general population: a report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia* 53:2312–2319
- Pirart J, Lauvaux JP, Rey W (1978) Blood sugar and diabetic complications. *N Engl J Med* 298:1149
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1997) Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes* 46:1829–1839
- Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y et al (1997) Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes: Genetique de la Nephropathie Diabetique (GENEDIAB) study group. *J Clin Invest* 99:1585–1595
- Al-Kateb H, Boright AP, Mirea L et al (2008) Multiple superoxide dismutase 1/splicing factor serine alanine 15 variants are associated with the development and progression of diabetic nephropathy: the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Genetics study. *Diabetes* 57:218–228
- Mohammedi K, Maimaitiming S, Emery N et al (2011) Allelic variations in superoxide dismutase-1 (SOD1) gene are associated with increased risk of diabetic nephropathy in type 1 diabetic subjects. *Mol Genet Metab* 104:654–660
- Du XL, Edelstein D, Rossetti L et al (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12222–12226
- Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813–820
- Brownlee M (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54:1615–1625
- Niedowicz DM, Daleke DL (2005) The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys* 43:289–330
- Ceriello A, Morocutti A, Mercuri F et al (2000) Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes* 49:2170–2177
- Coughlan MT, Mibus AL, Forbes JM (2008) Oxidative stress and advanced glycation in diabetic nephropathy. *Ann N Y Acad Sci* 1126: 190–193
- Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME (2008) Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes* 57:1446–1454
- Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32:595–603
- Deisseroth A, Dounce AL (1970) Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev* 50:319–375
- Breznicanu ML, Liu F, Wei CC et al (2007) Catalase overexpression attenuates angiotensinogen expression and apoptosis in diabetic mice. *Kidney Int* 71:912–923
- Breznicanu ML, Liu F, Wei CC et al (2008) Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. *Diabetes* 57: 451–459
- Hwang I, Lee J, Huh JY et al (2012) Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. *Diabetes* 61: 728–738



20. Shi Y, Lo CS, Chenier I et al (2013) Overexpression of catalase prevents hypertension and tubulo-fibrosis and normalization of renal angiotensin-converting enzyme-2 expression in Akita mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 304:F1335–F1346
21. Forsberg L, Lyrenas L, de Faire U, Morgenstem R (2001) A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radic Biol Med* 30:500–505
22. Hadjadj S, Belloum R, Bouhanick B et al (2001) Prognostic value of angiotensin-I converting enzyme I/D polymorphism for nephropathy in type 1 diabetes mellitus: a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 12:541–549
23. Vieira SM, Monteiro MB, Marques T et al (2011) Association of genetic variants in the promoter region of genes encoding p22phox (CYBA) and glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) and renal disease in patients with type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genet* 12:129
24. Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA et al (2006) Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 62:190–195
25. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D (1999) 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* 130:461–470
26. Kohner EM (1991) The lesions and natural history of diabetic retinopathy. In: Pickup J, Williams G (eds) *Textbook of diabetes*. Blackwell, Oxford, pp 575–588
27. Nyholt DR (2004) A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet* 74:765–769
28. Cao C, Leng Y, Kufe D (2003) Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. *J Biol Chem* 278:29667–29675
29. Hodgkinson AD, Bartlett T, Oates PJ, Millward BA, Demaine AG (2003) The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes* 52:846–851
30. Heistad DD (2006) Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:689–695
31. Montezano AC, Touyz RM (2012) Oxidative stress, Noxs, and hypertension: experimental evidence and clinical controversies. *Ann Med* 44(Suppl 1):S2–S16
32. Devi TS, Hosoya K, Terasaki T, Singh LP (2013) Critical role of TXNIP in oxidative stress, DNA damage and retinal pericyte apoptosis under high glucose: implications for diabetic retinopathy. *Exp Cell Res* 319:1001–1012
33. de Cavanagh EM, Inserra F, Ferder L, Fraga CG (2000) Enalapril and captopril enhance glutathione-dependent antioxidant defenses in mouse tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R572–R577
34. Lazaro A, Gallego-Delgado J, Justo P et al (2005) Long-term blood pressure control prevents oxidative renal injury. *Antioxid Redox Signal* 7:1285–1293
35. Portero-Otin M, Pamplona R, Boada J et al (2008) Inhibition of renin-angiotensin system decreases renal protein oxidative damage in diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 368:528–535
36. Chappell MC (2012) Nonclassical renin-angiotensin system and renal function. *Compr Physiol* 2:2733–2752
37. Ewens KG, George RA, Sharma K, Ziyadeh FN, Spielman RS (2005) Assessment of 115 candidate genes for diabetic nephropathy by transmission/disequilibrium test. *Diabetes* 54:3305–3318
38. Kottgen A, Pattaro C, Boger CA et al (2010) New loci associated with kidney function and chronic kidney disease. *Nat Genet* 42:376–384
39. Sandholm N, Salem RM, McKnight AJ et al (2012) New susceptibility loci associated with kidney disease in type 1 diabetes. *PLoS Genet* 8:e1002921
40. Perianayagam MC, Liangos O, Kolyada AY et al (2007) NADPH oxidase p22phox and catalase gene variants are associated with biomarkers of oxidative stress and adverse outcomes in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 18:255–263
41. Crawford A, Fassett RG, Coombes JS et al (2011) Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase genotypes and activities and the progression of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 26:2806–2813
42. Goth L, Nagy T, Kosa Z et al (2012) Effects of rs769217 and rs1001179 polymorphisms of catalase gene on blood catalase, carbohydrate and lipid biomarkers in diabetes mellitus. *Free Radic Res* 46:1249–1257
43. Godin N, Liu F, Lau GJ et al (2010) Catalase overexpression prevents hypertension and tubular apoptosis in angiotensinogen transgenic mice. *Kidney Int* 77:1086–1097

## 8. Referências

1. Keen HB, D.J. Textbook of Diabetes: The diagnosis and classification of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. 2 ed: Oxford: Blackwell Science, 1997; 1997.
2. Forlenza GP, Rewers M. The epidemic of type 1 diabetes: what is it telling us? Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity. 2011 Aug;18(4):248-51. PubMed PMID: 21844707.
3. Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Diabetes care. 1992 Nov;15(11):1509-16. PubMed PMID: 1468278. Epub 1992/11/01. eng.
4. Torquato MT, Montenegro Junior RM, Viana LA, de Souza RA, Lanna CM, Lucas JC, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirao Preto (Sao Paulo), Brazil. Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina. 2003 Nov 6;121(6):224-30. PubMed PMID: 14989137. Epub 2004/03/03. eng.
5. Goldenberg PS, S. e Franco, L.J. Prevalência de diabetes mellitus: diferenças de gênero e igualdade entre os sexos. . Revista Brasileira de Epidemiologia. 2003;6(1):18-28.
6. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes care. 2004 May;27(5):1047-53. PubMed PMID: 15111519. Epub 2004/04/28. eng.

7. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813-20. PubMed PMID: 11742414. Epub 2001/12/14. eng.
8. Eknoyan G, Nagy J. A history of diabetes mellitus or how a disease of the kidneys evolved into a kidney disease. *Advances in chronic kidney disease*. 2005 Apr;12(2):223-9. PubMed PMID: 15822058.
9. Kohlmann JOZ, M. T. Guias de medicina ambulatorial e hospitalar. In: Manole, editor. *Nefropatia diabética: diagnóstico e tratamento* 2002. p. 365-72.
10. Tang SC, Leung JC, Lai KN. Diabetic tubulopathy: an emerging entity. *Contributions to nephrology*. 2011;170:124-34. PubMed PMID: 21659765.
11. Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH, et al. Nephropathy in diabetes. *Diabetes care*. 2004 Jan;27 Suppl 1:S79-83. PubMed PMID: 14693934.
12. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes care*. 2005 Jan;28(1):164-76. PubMed PMID: 15616252.
13. Chaturvedi N, Bandinelli S, Mangili R, Penno G, Rottiers RE, Fuller JH. Microalbuminuria in type 1 diabetes: rates, risk factors and glycemic threshold. *Kidney international*. 2001 Jul;60(1):219-27. PubMed PMID: 11422754.
14. Hovind P, Tarnow L, Rossing P, Jensen BR, Graae M, Torp I, et al. Predictors for the development of microalbuminuria and macroalbuminuria in patients with type 1

---

diabetes: inception cohort study. *Bmj*. 2004 May 8;328(7448):1105. PubMed PMID: 15096438. Pubmed Central PMCID: 406322.

15. Wong TY, Shankar A, Klein R, Klein BE. Retinal vessel diameters and the incidence of gross proteinuria and renal insufficiency in people with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004 Jan;53(1):179-84. PubMed PMID: 14693713.

16. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR, et al. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney international*. 2003 Jan;63(1):225-32. PubMed PMID: 12472787.

17. System USRD. *USRDS 2013 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United System*. 2013.

18. Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*. 1982 Jun 26;1(8287):1430-2. PubMed PMID: 6123720.

19. Caramori ML, Fioretto P, Mauer M. The need for early predictors of diabetic nephropathy risk: is albumin excretion rate sufficient? *Diabetes*. 2000 Sep;49(9):1399-408. PubMed PMID: 10969821.

20. Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH, Finkelstein DM, Warram JH, Krolewski AS. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2003 Jun 5;348(23):2285-93. PubMed PMID: 12788992.

21. Magee GM, Bilous RW, Cardwell CR, Hunter SJ, Kee F, Fogarty DG. Is hyperfiltration associated with the future risk of developing diabetic nephropathy? A meta-analysis. *Diabetologia*. 2009 Apr;52(4):691-7. PubMed PMID: 19198800.
22. Ficociello LH, Perkins BA, Roshan B, Weinberg JM, Aschengrau A, Warram JH, et al. Renal hyperfiltration and the development of microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2009 May;32(5):889-93. PubMed PMID: 19196883. Pubmed Central PMCID: 2671109. Epub 2009/02/07. eng.
23. Brownlee M AL, Friedman E, Vinik AI, Nesto RW, Boulton AJM. *Complications of Diabetes Mellitus*. 10 ed: Philadelphia: Saunders; 2003.
24. Perkins BA, Krolewski AS. Early nephropathy in type 1 diabetes: the importance of early renal function decline. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009 May;18(3):233-40. PubMed PMID: 19300247. Pubmed Central PMCID: 2830878. Epub 2009/03/21. eng.
25. Costacou T, Ellis D, Fried L, Orchard TJ. Sequence of progression of albuminuria and decreased GFR in persons with type 1 diabetes: a cohort study. *Am J Kidney Dis*. 2007 Nov;50(5):721-32. PubMed PMID: 17954285. Epub 2007/10/24. eng.
26. Brouwers O, Niessen PM, Haenen G, Miyata T, Brownlee M, Stehouwer CD, et al. Hyperglycaemia-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in rat mesenteric arteries is mediated by intracellular methylglyoxal levels in a pathway dependent on oxidative stress. *Diabetologia*. 2010 May;53(5):989-1000. PubMed PMID: 20186387. Pubmed Central PMCID: 2850524.
27. Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA. [Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes]. *Arquivos brasileiros de*

endocrinologia e metabologia. 2008 Oct;52(7):1096-105. PubMed PMID: 19082297.

Estresse oxidativo: revisao da sinalizacao metabolica no diabetes tipo 1.

28. Huber PA, WP. Glutathione and related enzymes: Biological Roles and Importance in Pathological Processes. *Quimica Nova*. 2008;31(5):1170-9.

29. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999 Jan;13(1):23-30. PubMed PMID: 9872926.

30. Barbosa JH, Oliveira SL, Seara LT. [The role of advanced glycation end-products (AGEs) in the development of vascular diabetic complications]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2008 Aug;52(6):940-50. PubMed PMID: 18820805. O papel dos produtos finais da glicacao avancada (AGEs) no desencadeamento das complicacoes vasculares do diabetes.

31. Duran-Jimenez B, Dobler D, Moffatt S, Rabbani N, Streuli CH, Thornalley PJ, et al. Advanced glycation end products in extracellular matrix proteins contribute to the failure of sensory nerve regeneration in diabetes. *Diabetes*. 2009 Dec;58(12):2893-903. PubMed PMID: 19720799. Pubmed Central PMCID: 2780874.

32. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*. 2010 Oct 29;107(9):1058-70. PubMed PMID: 21030723. Pubmed Central PMCID: 2996922.

33. Ozcan S, Andrali SS, Cantrell JE. Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochimica et biophysica acta*. 2010 May-Jun;1799(5-6):353-64. PubMed PMID: 20202486. Pubmed Central PMCID: 2881704.

34. Goldberg HJ, Whiteside CI, Hart GW, Fantus IG. Posttranslational, reversible O-glycosylation is stimulated by high glucose and mediates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and Sp1 transcriptional activity in glomerular mesangial cells. *Endocrinology*. 2006 Jan;147(1):222-31. PubMed PMID: 16365142.
35. Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney international Supplement*. 2000 Sep;77:S26-30. PubMed PMID: 10997687.
36. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Oct 24;97(22):12222-6. PubMed PMID: 11050244. Pubmed Central PMCID: 17322.
37. Ukkola O, et al. Lack of association between polymorphisms of catalase, copper-zinc superoxide dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Intern Med*. 2001;249:451-9.
38. Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res*. 1994;54:1969-75.
39. Franco R, Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Archives of physiology and biochemistry*. 2007 Oct-Dec;113(4-5):234-58. PubMed PMID: 18158646.

40. Circu ML, Aw TY. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochimica et biophysica acta*. 2012 Oct;1823(10):1767-77. PubMed PMID: 22732297. Pubmed Central PMCID: 3437743.
41. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2005 Oct;16(10):577-86. PubMed PMID: 16111877.
42. Yu Y, Song J, Guo X, Wang S, Yang X, Chen L, et al. Characterization and structural analysis of human selenium-dependent glutathione peroxidase 4 mutant expressed in *Escherichia coli*. *Free radical biology & medicine*. 2014 Mar 28;71C:332-8. PubMed PMID: 24681209.
43. Villette S, Kyle JA, Brown KM, Pickard K, Milne JS, Nicol F, et al. A novel single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of human glutathione peroxidase 4 influences lipoxygenase metabolism. *Blood cells, molecules & diseases*. 2002 Sep-Oct;29(2):174-8. PubMed PMID: 12490284. Epub 2002/12/20. eng.
44. Bermano G, Pagmantidis V, Holloway N, Kadri S, Mowat NA, Shiel RS, et al. Evidence that a polymorphism within the 3'UTR of glutathione peroxidase 4 is functional and is associated with susceptibility to colorectal cancer. *Genes & nutrition*. 2007 Nov;2(2):225-32. PubMed PMID: 18850177. Pubmed Central PMCID: 2474949. Epub 2008/10/14. eng.
45. Gautrey H, Nicol F, Sneddon AA, Hall J, Hesketh J. A T/C polymorphism in the GPX4 3'UTR affects the selenoprotein expression pattern and cell viability in



transfected Caco-2 cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2011 Jun;1810(6):584-91. PubMed PMID: 21459128. Epub 2011/04/05. eng.

46. Meplan C, Crosley LK, Nicol F, Horgan GW, Mathers JC, Arthur JR, et al. Functional effects of a common single-nucleotide polymorphism (GPX4c718t) in the glutathione peroxidase 4 gene: interaction with sex. *The American journal of clinical nutrition*. 2008 Apr;87(4):1019-27. PubMed PMID: 18400727. Epub 2008/04/11. eng.

47. Muse KE, Oberley TD, Sempf JM, Oberley LW. Immunolocalization of antioxidant enzymes in adult hamster kidney. *The Histochemical journal*. 1994 Sep;26(9):734-53. PubMed PMID: 7843985. Epub 1994/09/01. eng.

48. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology & medicine*. 2001 Dec 1;31(11):1287-312. PubMed PMID: 11728801. Epub 2001/12/01. eng.

49. dos Santos KG, Canani LH, Gross JL, Tschiedel B, Souto KE, Roisenberg I. The catalase -262C/T promoter polymorphism and diabetic complications in Caucasians with type 2 diabetes. *Disease markers*. 2006;22(5-6):355-9. PubMed PMID: 17264407. Epub 2007/02/01. eng.

50. Flekac M, Skrha J, Hilgertova J, Lacinova Z, Jarolimkova M. Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC medical genetics*. 2008;9:30. PubMed PMID: 18423055. Pubmed Central PMCID: 2386118. Epub 2008/04/22. eng.

51. Panduru NM, Mota E, Mota M, Cimponeriu D, Serafinceanu C, Cheta DM. Polymorphism of catalase gene promoter in Romanian patients with diabetic kidney

disease and type 1 diabetes. Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne. 2010;48(1):81-8. PubMed PMID: 21180245.

52. Tarnai I, Csordas M, Sukei E, Shemirani AH, Kaplar M, Goth L. Effect of C111T polymorphism in exon 9 of the catalase gene on blood catalase activity in different types of diabetes mellitus. Free radical research. 2007 Jul;41(7):806-11. PubMed PMID: 17577741. Epub 2007/06/20. eng.

53. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiological reviews. 2007 Jan;87(1):245-313. PubMed PMID: 17237347. Epub 2007/01/24. eng.

54. Sedeek M, Nasrallah R, Touyz RM, Hebert RL. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 2013 Oct;24(10):1512-8. PubMed PMID: 23970124. Pubmed Central PMCID: 3785272.

55. Lim SC, Liu JJ, Low HQ, Morgenthaler NG, Li Y, Yeoh LY, et al. Microarray analysis of multiple candidate genes and associated plasma proteins for nephropathy secondary to type 2 diabetes among Chinese individuals. Diabetologia. 2009 Jul;52(7):1343-51. PubMed PMID: 19415232.

56. Xiang FL, Lu X, Strutt B, Hill DJ, Feng Q. NOX2 deficiency protects against streptozotocin-induced beta-cell destruction and development of diabetes in mice. Diabetes. 2010 Oct;59(10):2603-11. PubMed PMID: 20627937. Pubmed Central PMCID: 3279537.

57. Segura J, Ruilope LM. [Contribution of the kidney to glucose homeostasis]. *Medicina clinica*. 2013 Sep;141 Suppl 2:26-30. PubMed PMID: 24444521. Contribucion del rinon en la homeostasis de la glucosa.
58. Wright EM, Hirayama BA, Loo DF. Active sugar transport in health and disease. *Journal of internal medicine*. 2007 Jan;261(1):32-43. PubMed PMID: 17222166.
59. Cersosimo E, Solis-Herrera C, Triplitt C. Inhibition of renal glucose reabsorption as a novel treatment for diabetes patients. *Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia*. 2014 Jan-Mar;36(1):80-92. PubMed PMID: 24676619.
60. Wright EM. Renal Na(+)-glucose cotransporters. *American journal of physiology Renal physiology*. 2001 Jan;280(1):F10-8. PubMed PMID: 11133510.
61. Uldry M, Thorens B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2004 Feb;447(5):480-9. PubMed PMID: 12750891.
62. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular aspects of medicine*. 2013 Apr-Jun;34(2-3):121-38. PubMed PMID: 23506862.
63. Freitas HS, Schaan BD, David-Silva A, Sabino-Silva R, Okamoto MM, Alves-Wagner AB, et al. SLC2A2 gene expression in kidney of diabetic rats is regulated by HNF-1alpha and HNF-3beta. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009 Jun 16;305(1-2):63-70. PubMed PMID: 19433262.

64. Molina-Jijon ER-M, R; Namorado, M C; Pedraza-Chaverri, J; Reyes, J L. Oxidative Stress Induces Claudin-2 Nitration in Experimental Type 1 Diabetic Nephropathy. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;72:162 - 75.
65. Marks J, Carvou NJ, Debnam ES, Srail SK, Unwin RJ. Diabetes increases facilitative glucose uptake and GLUT2 expression at the rat proximal tubule brush border membrane. *The Journal of physiology*. 2003 Nov 15;553(Pt 1):137-45. PubMed PMID: 12963802. Pubmed Central PMCID: 2343472.
66. Boudry G, Cheeseman CI, Perdue MH. Psychological stress impairs Na<sup>+</sup>-dependent glucose absorption and increases GLUT2 expression in the rat jejunal brush-border membrane. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007 Feb;292(2):R862-7. PubMed PMID: 17053095.
67. Goestemeyer AK, Marks J, Srail SK, Debnam ES, Unwin RJ. GLUT2 protein at the rat proximal tubule brush border membrane correlates with protein kinase C (PKC)-beta and plasma glucose concentration. *Diabetologia*. 2007 Oct;50(10):2209-17. PubMed PMID: 17694297.
68. Michau A, Guillemain G, Grosfeld A, Vuillaumier-Barrot S, Grand T, Keck M, et al. Mutations in SLC2A2 gene reveal hGLUT2 function in pancreatic beta cell development. *J Biol Chem*. 2013 Oct 25;288(43):31080-92. PubMed PMID: 23986439. Pubmed Central PMCID: 3829421.
69. Le MT, Lobmeyer MT, Campbell M, Cheng J, Wang Z, Turner ST, et al. Impact of genetic polymorphisms of SLC2A2, SLC2A5, and KHK on metabolic phenotypes in hypertensive individuals. *PloS one*. 2013;8(1):e52062. PubMed PMID: 23341889. Pubmed Central PMCID: 3544854.

70. Borglykke A, Grarup N, Sparso T, Linneberg A, Fenger M, Jeppesen J, et al. Genetic variant SLC2A2 [corrected] Is associated with risk of cardiovascular disease - assessing the individual and cumulative effect of 46 type 2 diabetes related genetic variants. *PloS one*. 2012;7(11):e50418. PubMed PMID: 23185617. Pubmed Central PMCID: 3503928.
71. Vionnet N, Tregouet D, Kazeem G, Gut I, Groop PH, Tarnow L, et al. Analysis of 14 candidate genes for diabetic nephropathy on chromosome 3q in European populations: strongest evidence for association with a variant in the promoter region of the adiponectin gene. *Diabetes*. 2006 Nov;55(11):3166-74. PubMed PMID: 17065357.
72. Hadjadj S, Belloum R, Bouhanick B, Gallois Y, Guilloteau G, Chatellier G, et al. Prognostic value of angiotensin-I converting enzyme I/D polymorphism for nephropathy in type 1 diabetes mellitus: a prospective study. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2001 Mar;12(3):541-9. PubMed PMID: 11181802.
73. Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, et al. Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes: Genetique de la Nephropathie Diabetique (GENEDIAB) study group. *The Journal of clinical investigation*. 1997 Apr 1;99(7):1585-95. PubMed PMID: 9120002. Pubmed Central PMCID: 507978. Epub 1997/04/01. eng.
74. Mohammedi K, Patente TA, Bellili-Munoz N, Driss F, Monteiro MB, Roussel R, et al. Catalase activity, allelic variations in the catalase gene and risk of kidney complications in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2013 Sep 21. PubMed PMID: 24057136.

75. Hadjadj S, Pean F, Gallois Y, Passa P, Aubert R, Weekers L, et al. Different patterns of insulin resistance in relatives of type 1 diabetic patients with retinopathy or nephropathy: the Genesis France-Belgium Study. *Diabetes care*. 2004 Nov;27(11):2661-8. PubMed PMID: 15505002. Epub 2004/10/27. eng.
76. 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. *Annals of internal medicine*. 1999 Mar 16;130(6):461-70. PubMed PMID: 10075613. Epub 1999/03/13. eng.
77. Mohammedi K, Maimaitiming S, Emery N, Bellili-Munoz N, Roussel R, Fumeron F, et al. Allelic variations in superoxide dismutase-1 (SOD1) gene are associated with increased risk of diabetic nephropathy in type 1 diabetic subjects. *Molecular genetics and metabolism*. 2011 Dec;104(4):654-60. PubMed PMID: 21963083. Epub 2011/10/04. eng.
78. Kohner EM. The lesions and natural history of diabetic retinopathy. In: Scientific B, editor. *Text Book of Diabetes*. Oxford 1991. p. 575 - 88.
79. Moreno MU, San Jose G, Fortuno A, Beloqui O, Redon J, Chaves FJ, et al. A novel CYBA variant, the -675A/T polymorphism, is associated with essential hypertension. *Journal of hypertension*. 2007 Aug;25(8):1620-6. PubMed PMID: 17620958. Epub 2007/07/11. eng.
80. Vieira SM, Monteiro MB, Marques T, Luna AM, Fortes MA, Nery M, et al. Association of genetic variants in the promoter region of genes encoding p22phox (CYBA) and glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) and renal disease in

---

patients with type 1 diabetes mellitus. *BMC medical genetics*. 2011;12:129. PubMed PMID: 21962117. Pubmed Central PMCID: 3206419. Epub 2011/10/04. eng.

81. Nyholt DR. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *American journal of human genetics*. 2004 Apr;74(4):765-9. PubMed PMID: 14997420. Pubmed Central PMCID: 1181954.

82. Team RC. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. 2013.

83. Monteiro MB, Patente TA, Mohammedi K, Queiroz MS, Azevedo MJ, Canani LH, et al. Sex-specific associations of variants in regulatory regions of NADPH oxidase-2 (CYBB) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) genes with kidney disease in type 1 diabetes. *Free radical research*. 2013 Oct;47(10):804-10. PubMed PMID: 23919599.

84. Ober C, Loisel DA, Gilad Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nature reviews Genetics*. 2008 Dec;9(12):911-22. PubMed PMID: 19002143. Pubmed Central PMCID: 2694620.

85. Zhao Q, Gu D, Kelly TN, Hixson JE, Rao DC, Jaquish CE, et al. Association of genetic variants in the apelin-APJ system and ACE2 with blood pressure responses to potassium supplementation: the GenSalt study. *American journal of hypertension*. 2010 Jun;23(6):606-13. PubMed PMID: 20224560. Pubmed Central PMCID: 2890255.

86. Polonikov AV, Vialykh EK, Churnosov MI, Illig T, Freidin MB, Vasil'eva OV, et al. The C718T polymorphism in the 3'-untranslated region of glutathione peroxidase-4 gene is a predictor of cerebral stroke in patients with essential hypertension.

Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension. 2012 May;35(5):507-12. PubMed PMID: 22158110. Epub 2011/12/14. eng.

87. Gasche C, Chang CL, Rhees J, Goel A, Boland CR. Oxidative stress increases frameshift mutations in human colorectal cancer cells. *Cancer research*. 2001 Oct 15;61(20):7444-8. PubMed PMID: 11606378.

88. Amantea D, Marrone MC, Nistico R, Federici M, Bagetta G, Bernardi G, et al. Oxidative stress in stroke pathophysiology validation of hydrogen peroxide metabolism as a pharmacological target to afford neuroprotection. *International review of neurobiology*. 2009;85:363-74. PubMed PMID: 19607981.

89. Goodman M, Bostick RM, Dash C, Terry P, Flanders WD, Mandel J. A summary measure of pro- and anti-oxidant exposures and risk of incident, sporadic, colorectal adenomas. *Cancer causes & control : CCC*. 2008 Dec;19(10):1051-64. PubMed PMID: 18543072.

90. McCann JC, Ames BN. Adaptive dysfunction of selenoproteins from the perspective of the triage theory: why modest selenium deficiency may increase risk of diseases of aging. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011 Jun;25(6):1793-814. PubMed PMID: 21402715.

91. Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ. Regulation and function of selenoproteins in human disease. *The Biochemical journal*. 2009 Aug 15;422(1):11-22. PubMed PMID: 19627257. Pubmed Central PMCID: 2912286.

92. Bermano G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR, et al. Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats.



The Biochemical journal. 1995 Oct 15;311 ( Pt 2):425-30. PubMed PMID: 7487877.  
Pubmed Central PMCID: 1136017.

93. de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, et al. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. J Biol Chem. 1998 Aug 28;273(35):22528-36. PubMed PMID: 9712879.

94. de Haan JB, Stefanovic N, Nikolic-Paterson D, Scurr LL, Croft KD, Mori TA, et al. Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. American journal of physiology Renal physiology. 2005 Sep;289(3):F544-51. PubMed PMID: 15827346. Epub 2005/04/14. eng.

95. Ruiz C, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda J. Selenium, zinc and copper in plasma of patients with type 1 diabetes mellitus in different metabolic control states. J Trace Elem Med Biol. 1998 Jul;12(2):91-5. PubMed PMID: 9760417. Epub 1998/10/07. eng.

96. Reddi AS, Bollineni JS. Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF-beta1 in normal and diabetic rats. Kidney international. 2001 Apr;59(4):1342-53. PubMed PMID: 11260395. Epub 2001/03/22. eng.

97. Sadi G, Eryilmaz N, Tutuncuoglu E, Cingir S, Guray T. Changes in expression profiles of antioxidant enzymes in diabetic rat kidneys. Diabetes Metab Res Rev. 2012 Mar;28(3):228-35. PubMed PMID: 22057777. Epub 2011/11/08. eng.

98. Tarazona-Santos E, Bernig T, Burdett L, Magalhaes WC, Fabbri C, Liao J, et al. CYBB, an NADPH-oxidase gene: restricted diversity in humans and evidence for differential long-term purifying selection on transmembrane and cytosolic domains. *Human mutation*. 2008 May;29(5):623-32. PubMed PMID: 18278805. Epub 2008/02/19. eng.
99. Uhlemann AC, Szlezak NA, Vonthein R, Tomiuk J, Emmer SA, Lell B, et al. DNA phasing by TA dinucleotide microsatellite length determines in vitro and in vivo expression of the gp91phox subunit of NADPH oxidase and mediates protection against severe malaria. *The Journal of infectious diseases*. 2004 Jun 15;189(12):2227-34. PubMed PMID: 15181570. Epub 2004/06/08. eng.
100. Soares-Souza GB, Tarazona-Santos E, Chanock SJ. Characterization of a candidate locus for malaria susceptibility in human populations: a (TA)<sub>n</sub> microsatellite in the promoter region of the CYBB gene, the gp91 phox subunit of the NADPH oxidase. *Int J Immunogenet*. 2008 Apr;35(2):107-9. PubMed PMID: 18321306.
101. Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Quinn MT, Fujita T, et al. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. *Kidney international*. 2005 May;67(5):1890-8. PubMed PMID: 15840036. Epub 2005/04/21. eng.
102. Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J, et al. Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment. *Diabetologia*. 2003 Oct;46(10):1428-37. PubMed PMID: 13680125. Epub 2003/09/19. eng.

103. Hodgkinson AD, Millward BA, Demaine AG. Association of the p22phox component of NAD(P)H oxidase with susceptibility to diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2003 Nov;26(11):3111-5. PubMed PMID: 14578247.
104. Cao C, Leng Y, Kufe D. Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. *J Biol Chem*. 2003 Aug 8;278(32):29667-75. PubMed PMID: 12777400.
105. Hodgkinson AD, Bartlett T, Oates PJ, Millward BA, Demaine AG. The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2003 Mar;52(3):846-51. PubMed PMID: 12606529.
106. Kumawat M, Sharma TK, Singh I, Singh N, Ghalaut VS, Vardey SK, et al. Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with and without Nephropathy. *North American journal of medical sciences*. 2013 Mar;5(3):213-9. PubMed PMID: 23626958. Pubmed Central PMCID: 3632026.
107. Kottgen A, Pattaro C, Boger CA, Fuchsberger C, Olden M, Glazer NL, et al. New loci associated with kidney function and chronic kidney disease. *Nat Genet*. 2010 May;42(5):376-84. PubMed PMID: 20383146. Pubmed Central PMCID: 2997674.
108. Sandholm N, Salem RM, McKnight AJ, Brennan EP, Forsblom C, Isakova T, et al. New susceptibility loci associated with kidney disease in type 1 diabetes. *PLoS Genet*. 2012 Sep;8(9):e1002921. PubMed PMID: 23028342. Pubmed Central PMCID: 3447939.
109. Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and

mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *The Journal of clinical investigation*. 1990 Nov;86(5):1729-37. PubMed PMID: 2243141. Pubmed Central PMCID: 296926. Epub 1990/11/01. eng.

110. Doi K, Noiri E, Nakao A, Fujita T, Kobayashi S, Tokunaga K. Haplotype analysis of NAD(P)H oxidase p22 phox polymorphisms in end-stage renal disease. *Journal of human genetics*. 2005;50(12):641-7. PubMed PMID: 16215641. Epub 2005/10/11. eng.

111. Moreno MU, San Jose G, Orbe J, Paramo JA, Beloqui O, Diez J, et al. Preliminary characterisation of the promoter of the human p22(phox) gene: identification of a new polymorphism associated with hypertension. *FEBS letters*. 2003 May 8;542(1-3):27-31. PubMed PMID: 12729892. Epub 2003/05/06. eng.

112. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation*. 2000 Oct 10;102(15):1744-7. PubMed PMID: 11023926. Epub 2000/10/12. eng.

113. Shimo-Nakanishi Y, Hasebe T, Suzuki A, Mochizuki H, Nomiyama T, Tanaka Y, et al. Functional effects of NAD(P)H oxidase p22(phox) C242T mutation in human leukocytes and association with thrombotic cerebral infarction. *Atherosclerosis*. 2004 Jul;175(1):109-15. PubMed PMID: 15186954. Epub 2004/06/10. eng.

114. Kim KI, Na JE, Kang SY, Cho YS, Choi DJ, Kim CH, et al. Impact of NAD(P)H oxidase p22 phox gene polymorphism on vascular aging in Korean centenarian and nonagenarian. *International journal of cardiology*. 2007 Dec 15;123(1):18-22. PubMed PMID: 17307262. Epub 2007/02/20. eng.

115. Ito D, Murata M, Watanabe K, Yoshida T, Saito I, Tanahashi N, et al. C242T polymorphism of NADPH oxidase p22 PHOX gene and ischemic cerebrovascular disease in the Japanese population. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2000 Apr;31(4):936-9. PubMed PMID: 10754002. Epub 2001/02/07. eng.
116. Santos KG, Canani LH, Gross JL, Tschiedel B, Souto KE, Roisenberg I. Relationship of p22phox C242T polymorphism with nephropathy in type 2 diabetic patients. *Journal of nephrology*. 2005 Nov-Dec;18(6):733-8. PubMed PMID: 16358232. Epub 2005/12/17. eng.
117. Nibali L, Parkar M, Brett P, Knight J, Tonetti MS, Griffiths GS. NADPH oxidase (CYBA) and FcgammaR polymorphisms as risk factors for aggressive periodontitis: a case-control association study. *Journal of clinical periodontology*. 2006 Aug;33(8):529-39. PubMed PMID: 16899095. Epub 2006/08/11. eng.
118. Nasti S, Spallarossa P, Altieri P, Garibaldi S, Fabbi P, Polito L, et al. C242T polymorphism in CYBA gene (p22phox) and risk of coronary artery disease in a population of Caucasian Italians. *Disease markers*. 2006;22(3):167-73. PubMed PMID: 16788250. Epub 2006/06/22. eng.
119. Niemiec P, Zak I, Wita K. The 242T variant of the CYBA gene polymorphism increases the risk of coronary artery disease associated with cigarette smoking and hypercholesterolemia. *Coronary artery disease*. 2007 Aug;18(5):339-46. PubMed PMID: 17627182. Epub 2007/07/14. eng.
120. Perianayagam MC, Liangos O, Kolyada AY, Wald R, MacKinnon RW, Li L, et al. NADPH oxidase p22phox and catalase gene variants are associated with biomarkers of oxidative stress and adverse outcomes in acute renal failure. *Journal of the American*

Society of Nephrology : JASN. 2007 Jan;18(1):255-63. PubMed PMID: 17151330. Epub 2006/12/08. eng.

121. Moreno MU, San Jose G, Fortuno A, Beloqui O, Diez J, Zalba G. The C242T CYBA polymorphism of NADPH oxidase is associated with essential hypertension. *Journal of hypertension*. 2006 Jul;24(7):1299-306. PubMed PMID: 16794479. Epub 2006/06/24. eng.

122. Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Ohtoshi K, Yasuda T, Katakami N, Hirano T, et al. NAD (P) H oxidase p22 phox C242T polymorphism affects LDL particle size and insulin resistance in Japanese subjects. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2002;9(4):200-5. PubMed PMID: 12226552. Epub 2002/09/13. eng.

123. Farrag W, Eid M. Association of the C242T polymorphism of the p22 phox gene with advanced carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. *Molecular medicine reports*. 2008 Sep-Oct;1(5):679-84. PubMed PMID: 21479469. Epub 2008/09/01. eng.

124. Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Sakamoto K, Ohtoshi K, Katakami N, et al. Association of NAD(P)H oxidase p22 phox gene variation with advanced carotid atherosclerosis in Japanese type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2003 Feb;26(2):458-63. PubMed PMID: 12547880. Epub 2003/01/28. eng.

125. Mehranpour P, Wang SS, Blanco RR, Li W, Song Q, Lassegue B, et al. The C242T CYBA polymorphism as a major determinant of NADPH oxidase activity in patients with cardiovascular disease. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry*. 2009 Jul;7(3):251-9. PubMed PMID: 19689263. Epub 2009/08/20. eng.

126. Fang S, Wang L, Jia C. Association of p22phox gene C242T polymorphism with coronary artery disease: a meta-analysis. *Thrombosis research*. 2010 May;125(5):e197-201. PubMed PMID: 20100625. Epub 2010/01/27. eng.
127. Lee WH, Hwang TH, Oh GT, Kwon SU, Choi YH, Park JE. Genetic factors associated with endothelial dysfunction affect the early onset of coronary artery disease in Korean males. *Vasc Med*. 2001;6(2):103-8. PubMed PMID: 11530961. Epub 2001/09/04. eng.
128. Narne P, Ponnaluri KC, Singh S, Siraj M, Ishaq M. Relationship between NADPH oxidase p22phox C242T, PARP-1 Val762Ala polymorphisms, angiographically verified coronary artery disease and myocardial infarction in South Indian patients with type 2 diabetes mellitus. *Thrombosis research*. 2012 Nov;130(5):e259-65. PubMed PMID: 23040216. Epub 2012/10/09. eng.
129. Ge J, Ding Z, Song Y, Wang F. Smoking dose modifies the association between C242T polymorphism and prevalence of metabolic syndrome in a Chinese population. *PloS one*. 2012;7(3):e31926. PubMed PMID: 22396743. Pubmed Central PMCID: 3291574. Epub 2012/03/08. eng.
130. Li A, Prasad A, Mincemoyer R, Satorius C, Epstein N, Finkel T, et al. Relationship of the C242T p22phox gene polymorphism to angiographic coronary artery disease and endothelial function. *American journal of medical genetics*. 1999 Sep 3;86(1):57-61. PubMed PMID: 10440830. Epub 1999/08/10. eng.
131. Saha N, Sanghera DK, Kamboh MI. The p22 phox polymorphism C242T is not associated with CHD risk in Asian Indians and Chinese. *European journal of clinical*

investigation. 1999 Dec;29(12):999-1002. PubMed PMID: 10583446. Epub 1999/12/03. eng.

132. Weiss J, Haefeli WE, Gasse C, Hoffmann MM, Weyman J, Gibbs S, et al. Lack of evidence for association of high altitude pulmonary edema and polymorphisms of the NO pathway. *High altitude medicine & biology*. 2003 Fall;4(3):355-66. PubMed PMID: 14561241. Epub 2003/10/17. eng.

133. San Jose G, Moreno MU, Oliván S, Beloqui O, Fortuno A, Díez J, et al. Functional effect of the p22phox -930A/G polymorphism on p22phox expression and NADPH oxidase activity in hypertension. *Hypertension*. 2004 Aug;44(2):163-9. PubMed PMID: 15210651. Epub 2004/06/24. eng.

134. Lim SC, Goh SK, Lai YR, Tee WW, Koh A, Xu XH, et al. Relationship between common functional polymorphisms of the p22phox gene (-930A > G and +242C > T) and nephropathy as a result of Type 2 diabetes in a Chinese population. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2006 Sep;23(9):1037-41. PubMed PMID: 16922713. Epub 2006/08/23. eng.

135. Kokubo Y, Iwai N, Tago N, Inamoto N, Okayama A, Yamawaki H, et al. Association analysis between hypertension and CYBA, CLCNKB, and KCNMB1 functional polymorphisms in the Japanese population--the Suita Study. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2005 Feb;69(2):138-42. PubMed PMID: 15671602. Epub 2005/01/27. eng.

136. Stiefel P, Miranda ML, Bellido LM, Luna J, Jimenez L, Pamies E, et al. Genotype of the CYBA promoter -930A/G, polymorphism C677T of the MTHFR and APOE genotype in patients with hypertensive disorders of pregnancy: an observational



study. *Medicina clinica*. 2009 Nov 7;133(17):657-61. PubMed PMID: 19853876. Epub 2009/10/27. eng.

137. Xaplanteris P, Vlachopoulos C, Baou K, Vassiliadou C, Dima I, Ioakeimidis N, et al. The effect of p22(phox) -930A/G, A640G and C242T polymorphisms of NADPH oxidase on peripheral and central pressures in healthy, normotensive individuals. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2010 Aug;33(8):814-8. PubMed PMID: 20505675. Epub 2010/05/28. eng.

138. Ochoa MC, Razquin C, Zalba G, Martinez-Gonzalez MA, Martinez JA, Marti A. G allele of the -930A>G polymorphism of the CYBA gene is associated with insulin resistance in obese subjects. *Journal of physiology and biochemistry*. 2008 Jun;64(2):127-33. PubMed PMID: 19043982. Epub 2008/12/03. eng.

139. Fan M, Raitakari OT, Kahonen M, Juonala M, Hutri-Kahonen N, Porsti I, et al. The association between cigarette smoking and carotid intima-media thickness is influenced by the -930A/G CYBA gene polymorphism: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *American journal of hypertension*. 2009 Mar;22(3):281-7. PubMed PMID: 19151692. Epub 2009/01/20. eng.

140. Vibhuti A, Arif E, Mishra A, Deepak D, Singh B, Rahman I, et al. CYP1A1, CYP1A2 and CYBA gene polymorphisms associated with oxidative stress in COPD. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2010 Apr 2;411(7-8):474-80. PubMed PMID: 20080081. Epub 2010/01/19. eng.

141. Goliash G, Wiesbauer F, Grafl A, Ponweiser E, Blessberger H, Tentzeris I, et al. The effect of p22-PHOX (CYBA) polymorphisms on premature coronary artery

disease ( $\leq$  40 years of age). *Thrombosis and haemostasis*. 2011 Mar;105(3):529-34. PubMed PMID: 21136016. Epub 2010/12/08. eng.

142. Mishra A, Ali Z, Vibhuti A, Kumar R, Alam P, Ram R, et al. CYBA and GSTP1 variants associate with oxidative stress under hypobaric hypoxia as observed in high-altitude pulmonary oedema. *Clin Sci (Lond)*. 2012 Mar;122(6):299-309. PubMed PMID: 21973220. Epub 2011/10/07. eng.

143. San Jose G, Fortuno A, Beloqui O, Diez J, Zalba G. NADPH oxidase CYBA polymorphisms, oxidative stress and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)*. 2008 Feb;114(3):173-82. PubMed PMID: 18184111.

144. Lewis EM, Singla M, Sergeant S, Koty PP, McPhail LC. X-linked chronic granulomatous disease secondary to skewed X chromosome inactivation in a female with a novel CYBB mutation and late presentation. *Clin Immunol*. 2008 Nov;129(2):372-80. PubMed PMID: 18774749. Pubmed Central PMCID: 2599929.

145. Parkos CA, Dinauer MC, Jesaitis AJ, Orkin SH, Curnutte JT. Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease. *Blood*. 1989 May 1;73(6):1416-20. PubMed PMID: 2713485.

146. Sedeek M, Gutsol A, Montezano AC, Burger D, Nguyen Dinh Cat A, Kennedy CR, et al. Renoprotective effects of a novel Nox1/4 inhibitor in a mouse model of Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2013 Feb;124(3):191-202. PubMed PMID: 22920224.

147. Sedeek M, Callera G, Montezano A, Gutsol A, Heitz F, Szyndralewicz C, et al. Critical role of Nox4-based NADPH oxidase in glucose-induced oxidative stress in the

kidney: implications in type 2 diabetic nephropathy. *American journal of physiology Renal physiology*. 2010 Dec;299(6):F1348-58. PubMed PMID: 20630933.

148. You YH, Okada S, Ly S, Jandeleit-Dahm K, Barit D, Namikoshi T, et al. Role of Nox2 in diabetic kidney disease. *American journal of physiology Renal physiology*. 2013 Apr 1;304(7):F840-8. PubMed PMID: 23389458. Pubmed Central PMCID: 3625848.

149. Yong R, Chen XM, Shen S, Vijayaraj S, Ma Q, Pollock CA, et al. Plumbagin ameliorates diabetic nephropathy via interruption of pathways that include NOX4 signalling. *PloS one*. 2013;8(8):e73428. PubMed PMID: 23991195. Pubmed Central PMCID: 3753271.

150. Oh SW, Lee ES, Kim S, Na KY, Chae DW, Kim S, et al. Bilirubin attenuates the renal tubular injury by inhibition of oxidative stress and apoptosis. *BMC nephrology*. 2013;14:105. PubMed PMID: 23683031. Pubmed Central PMCID: 3681641.

151. Huang J, Hitt ND, Kleinberg ME. Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558. *Biochemistry*. 1995 Dec 26;34(51):16753-7. PubMed PMID: 8527449.

152. Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cellular signalling*. 2006 Jan;18(1):69-82. PubMed PMID: 15927447.

153. Lyle AN, Deshpande NN, Taniyama Y, Seidel-Rogol B, Pounkova L, Du P, et al. Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 2009 Jul 31;105(3):249-59. PubMed PMID: 19574552. Pubmed Central PMCID: 2744198.

154. Diaz B, Shani G, Pass I, Anderson D, Quintavalle M, Courtneidge SA. Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. *Science signaling*. 2009;2(88):ra53. PubMed PMID: 19755709. Pubmed Central PMCID: 2810640.
155. Gianni D, Bohl B, Courtneidge SA, Bokoch GM. The involvement of the tyrosine kinase c-Src in the regulation of reactive oxygen species generation mediated by NADPH oxidase-1. *Molecular biology of the cell*. 2008 Jul;19(7):2984-94. PubMed PMID: 18463161. Pubmed Central PMCID: 2441655.
156. Kulkarni GV, Chng T, Eny KM, Nielsen D, Wessman C, El-Sohemy A. Association of GLUT2 and TAS1R2 genotypes with risk for dental caries. *Caries research*. 2013;47(3):219-25. PubMed PMID: 23257979.
157. Eny KM, Wolever TM, Fontaine-Bisson B, El-Sohemy A. Genetic variant in the glucose transporter type 2 is associated with higher intakes of sugars in two distinct populations. *Physiological genomics*. 2008 May 13;33(3):355-60. PubMed PMID: 18349384.
158. Laukkanen O, Lindstrom J, Eriksson J, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, et al. Polymorphisms in the SLC2A2 (GLUT2) gene are associated with the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes*. 2005 Jul;54(7):2256-60. PubMed PMID: 15983230.