

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA**

MESTRADO

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
METABOLISMO E NUTRIÇÃO**

**POLIMORFISMOS DE INSERÇÃO/DELEÇÃO DO GENE DA ECA E K121Q
DO GENE PC-1 EM PACIENTES COM DIABETE MELITO TIPO 1
NORMOALBUMINÚRICOS: ESTUDO COM 10 ANOS DE
ACOMPANHAMENTO**

CAROLINE ABRÃO DALMÁZ

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirela Jobim de Azevedo

Co-orientadores: Prof. Dr. Jorge Luiz Gross

Prof^a. Dr^a Ana Luiza Maia

Porto Alegre, Novembro de 2001

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA
MESTRADO**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
METABOLISMO E NUTRIÇÃO**

**POLIMORFISMOS DE INSERÇÃO/DELEÇÃO DO GENE DA ECA E K121Q
DO GENE PC-1 EM PACIENTES COM DIABETE MELITO TIPO 1
NORMOALBUMINÚRICOS: ESTUDO COM 10 ANOS DE
ACOMPANHAMENTO**

CAROLINE ABRÃO DALMÁZ

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirela Jobim de Azevedo

Co-orientadores: Prof. Dr. Jorge Luiz Gross

Prof^a. Dr^a Ana Luiza da Silva Maia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia,
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
para obtenção de Título de Mestre

Porto Alegre, Novembro de 2001

“A conduta humana se parece muito com o desenho. A perspectiva se altera quando o olho muda de posição. Não depende do objeto e sim de quem está olhando”.

(Vincent Van Gogh)

A meus pais,

Carlos e Maria Helena, por seu amor, incansável dedicação, pela vida....

A meu marido,

Marcelo Dalmáz, por todo amor sempre presente.....

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Mirela Jobim de Azevedo, por sua dedicação, objetividade e inestimável competência.

A meu co-orientador, Prof. Dr. Jorge Luiz Gross, por sua contribuição e apoio à minha formação profissional.

À minha co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Ana Luiza da Silva Maia, pelos ensinamentos de Biologia Molecular.

Aos pacientes por tornarem possível a realização deste trabalho, iniciado há mais de 10 anos por minha orientadora.

A meus irmãos, Alessandra e Guilherme, sempre presentes em minha vida.

À Dra. Miriam Pecis e Dra. Maria Luiza Caramori pela colaboração neste projeto.

Aos colegas do laboratório Lenara Golbert, Márcia Puñales, Richard Alvarenga, Márcia Wagner, Paula Eichler e Clara Capp .

À Prof^ª. Dr^ª . Cileide Moulin e a colega Magda Perassolo onde tudo começou e onde fui tão feliz.

Ao amigo, Dr. Luís Henrique Santos Canani, incentivador e colaborador sempre.

Ao Prof. Dr. Francisco Lulhier, que em muito estimulou a formação acadêmica.

Às secretárias Rosângela Rodrigues e Rozelaine Hunning pela amizade e competência.

À secretária Marília Menezes, pelo atendimento aos alunos de pós-graduação.

E a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1 - RESUMO

2 - SUMMARY

3 – BREVE HISTÓRICO

4 - INTRODUÇÃO 1

4.1 – Importância e Epidemiologia da Nefropatia Diabética 1

4.2 - Patogênese e Fatores de Risco da Nefropatia Diabética 2

4.3 – Polimorfismo do Gene da ECA 10

4.4 - Polimorfismo K121Q do gene da PC-1 12

5 - OBJETIVO 16

6 - PACIENTES E MÉTODOS 17

6.1 - Delineamento do Estudo 17

6.2 - Pacientes 17

6.3 - Avaliação clínica e definições de desfechos	20
6.4 Métodos	22
6.4.1 – Análise dos polimorfismos genéticos	22
6.4.2 – Extração de DNA	23
6.4.3 - Análise do Polimorfismo I/D do gene da ECA	23
6.4.4 - Análise do Polimorfismo K121Q do gene da PC-1	24
6.5 Avaliação da função renal, controle metabólico e outras medidas	25
6.6 - Análise Estatística	27
7 - RESULTADOS	29
7.1 – I - Modificações nos parâmetros da função renal, níveis de pressão arterial e desenvolvimento de complicações microvasculares	29
7.2 - II - Características dos pacientes agrupados de acordo com o polimorfismo I/D do gene da ECA	33
7.3 - III - Características dos pacientes agrupados de acordo com o polimorfismo K121Q do gene da PC-1	40
8 - DISCUSSÃO	45

9 - CONCLUSÕES	50
10 - APÊNDICES	51
Apêndice 1 – Termo de consentimento	
11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE ABREVIATURAS

CV: coeficiente de variação

DCV: doença cardiovascular

DM: diabete melito

ECA: enzima conversora da angiotensina

EUA: excreção urinária de albumina

HAS: hipertensão arterial sistêmica

IMC: índice de massa corporal

IRT: insuficiência renal terminal

ND: nefropatia diabética

PAS: pressão arterial sistólica

PAD: pressão arterial diastólica

TFG: taxa de filtração glomerular

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática do polimorfismo Inserção/Deleção do gene da Enzima Conversora de Angiotensina	13
FIGURA 2 – Receptor insulínico	14
FIGURA 3 – Variação da taxa de filtração glomerular anual de acordo com o polimorfismo do gene da ECA em pacientes DM tipo 1 normoalbuminúricos	31
FIGURA 4 – Gel de agarose a 2% ilustrativo da utilização diagnóstica por amplificação por PCR do polimorfismo I/D do gene da ECA: identificação dos genótipos	38
FIGURA 5 – Gel de agarose a 2% ilustrativo da utilização diagnóstica por amplificação por PCR da confirmação de genótipos DD do polimorfismo do gene da ECA utilizando oligonucleotídeo FYM	42
FIGURA 6 - Gel de agarose a 3% ilustrativo da utilização diagnóstica da enzima de restrição <i>Ava II</i>	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos dos polimorfismos dos genes da ECA e PC-1 e nefropatia diabética em pacientes com diabete melito tipo 1	15
Tabela 2 - Características no início do estudo dos pacientes DM tipo 1 de acordo com genótipo da ECA	36
Tabela 3 – Características no início e final do estudo dos pacientes DM tipo 1 agrupados de acordo com genótipo da ECA	37
Tabela 4 - Características no início do estudo dos pacientes DM tipo 1 agrupados de acordo com genótipo da PC-1	44
Tabela 5 – Características no início e final do estudo dos pacientes DM tipo 1 de acordo com genótipo da PC-1	39

1. RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar o papel do polimorfismo de I/D do gene da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e o polimorfismo K121Q da PC-1 nas modificações das taxas de filtração glomerular (TFG), excreção urinária de albumina (EUA) e pressão arterial em uma coorte de pacientes diabéticos tipo 1 normoalbuminúricos ($EUA < 20 \mu\text{g}/\text{min}$) em um estudo com seguimento de $10,2 \pm 2,0$ anos (6,5 a 13,3 anos). A EUA (imunoturbidimetria), TFG (técnica da injeção única de $^{51}\text{Cr-EDTA}$), HbA_{1c} (cromatografia de troca iônica) e pressão arterial foram medidas no início do estudo e a intervalos de $1,7 \pm 0,6$ anos. O polimorfismo I/D e K121Q foram determinados através da PCR e restrição enzimática. Onze pacientes apresentaram o genótipo II, 13 o ID e 6 apresentaram o genótipo DD. Pacientes com o alelo D (ID/DD) desenvolveram mais freqüentemente hipertensão arterial e retinopatia diabética. Os 3 pacientes do estudo que desenvolveram nefropatia diabética apresentaram o alelo D. Nos pacientes ID/DD ($n=19$) ocorreu maior redução da TFG quando comparados com os pacientes II ($n=11$) ($-0,39 \pm 0,29$ vs $-0,12 \pm 0,37$ ml/min/mês; $P=0,035$). A presença do alelo D, em análise de regressão múltipla linear ($R^2=0,15$; $F=4,92$; $P=0,035$) foi o único fator associado à redução da TFG ($-0,29 \pm 0,34$ ml/min/mês; $P<0,05$). Já o aumento da EUA ($\log \text{EUA} = 0,0275 \pm 0,042$ $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mês}$; $P=0,002$) foi associado somente aos níveis iniciais de EUA ($R^2=0,17$; $F=5,72$; $P=0,024$). Um aumento significativo ($P<0,05$) no desenvolvimento de

hipertensão arterial e de novos casos de retinopatia diabética foi observado somente nos pacientes com os genótipos ID/DD. Vinte e dois pacientes apresentaram genótipo KK, 7 KQ e 1 apresentou genótipo QQ. Pacientes com os genótipos KQ/QQ apresentaram um aumento significativo ($P=0,045$) de novos casos de retinopatia diabética.

Em conclusão a presença do alelo D nesta amostra de pacientes DM tipo 1 normoalbuminúricos e normotensos está associada com aumento na proporção de complicações microvasculares e hipertensão arterial.

2. SUMMARY

The aim of this study was to analyze the role of the ACE gene insertion/deletion (I/D) polymorphisms and of the PC-1 gene K121Q polymorphism in the changes of glomerular filtration rate (GFR), urinary albumin excretion rate (UAER), and blood pressure levels in a cohort of normoalbuminuric type 1 diabetic patients.

This was a 10.2 ± 2.0 year prospective study of 30 normotensive normoalbuminuric type 1 diabetic patients. UAER (immunoturbidimetry), GFR (^{51}Cr -EDTA single injection technique), GHb (ion-exchange chromatography) and blood pressure levels were measured at baseline and at 1.7 ± 0.6 year intervals. The presence of ACE gene I/D and PC-1 gene K121Q polymorphisms was determined by polymerase chain reaction and restriction enzyme techniques.

Eleven patients was a II genotype, 13 the ID and 6 was the DD genotype. Three patients developed diabetic nephropathy; all were carriers of allele D of the ACE gene. The presence of allele D was the only predictor ($R^2=0.15$; $F=4.92$; $P=0.035$) of the observed GFR decline (-0.29 ± 0.34 ml/min/month; $P<0.05$). UAER increased during the study (log UAER change = 0.0275 ± 0.042 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{month}$; $P=0.002$) and was associated with baseline UAER levels only ($R^2=0.17$; $F=5.72$; $P=0.024$). A significant increase ($P<0.05$) in cases of hypertension and new cases of retinopathy were observed only ID/DD and not in II patients. Twenty-two patients was KK genotype, 7 the KQ

and 1 was the QQ genotype. Patients with the KQ/QQ (n=8) presented a significant increase (P=0.045) in new cases of retinopathy. In conclusion the presence of D allele of ACE gene in this sample of normoalbuminuric normotensive type 1 diabetes patients was associated with a higher proportion of microvascular complications and hypertension.

BREVE HISTÓRICO

O trabalho apresentado nesta dissertação para a obtenção de Título de Mestre é o resultado de uma parte das atividades que desenvolvi no laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Endocrinologia.

Iniciei meu aprendizado nas técnicas de Biologia Molecular em março de 1998, quando iniciaram as atividades deste segmento no laboratório do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Endocrinologia da UFRGS. Neste período fui bolsista de Iniciação Científica da FAPERGS (março a dezembro de 1998), sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Ana Luiza da Silva Maia, aprendendo as técnicas de extração de DNA, PCR (*Polimerase Chain Reaction*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) voltadas ao diagnóstico de mutações associadas ao carcinoma medular de tireóide. Nesta ocasião, colaborei na realização do trabalho “Mutação no Ret–protoncogene (Cis634Arg) associada a neoplasia endócrina múltipla 2 A e líquen amilóide cutâneo” apresentado no *X Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, recebendo o título de destaque. Este trabalho também foi apresentado oralmente no *23º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia e III Congresso Paulista de Endocrinologia e Metabologia*, em novembro de 1998, São Paulo, SP, Brasil.

Paralelo a estas atividades, colaborei nos experimentos do Dr. Luís Henrique Canani na pesquisa dos possíveis genes associados à susceptibilidade genética para o desenvolvimento da nefropatia diabética. Inicialmente, analisamos o papel do polimorfismo de Inserção/Deleção (I/D) do gene da Enzima Conversora de Angiotensina

(ECA) em famílias de pacientes com Diabete Melito (DM) tipo 2. Os resultados não foram conclusivos pelo número ainda insuficiente de pacientes. Decidimos, então, ampliar a amostra, o que passou a ser feito pela Dr^a. Luciana Costa após viagem do Dr. Luís Henrique Canani para realizar seu programa de Pós-Doutorado em Boston, MA, EUA.

Em fevereiro de 1999 realizei estágio no Laboratório de Genética e Epidemiologia na Clínica Joslin (Harvard Medical School) em Boston, MA, EUA, adquirindo mais experiência e ampliando o conhecimento nas técnicas de PCR, ASOs (*Allele Specific Oligonucleotides*) e *Genotyping* (genotipagem). Este estágio foi supervisionado pelo Professor Dr. Andrzej Krolewski, chefe da seção de Genética e Epidemiologia.

No primeiro semestre de 1999 concluí o curso de graduação em Farmácia e Bioquímica, na PUC-RS, período em que realizei estágio curricular no **Hospital São Lucas**, Instituto de Pesquisas Biomédicas, sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Rosane Scheibe e Prof^a. Dr^a. Virgínia Schimidt. Este estágio me possibilitou adquirir uma visão mais ampla do papel da Biologia Molecular no diagnóstico molecular de doenças infecciosas, Mutação da Fibrose Cística Δ F508, além de Genotipagem de Apolipoproteína E (apo E) e Polimorfismo I/D do Gene da ECA.

Logo após a conclusão da graduação, em agosto de 1999, iniciei o Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Metabologia e Nutrição, da UFRGS, como aluna especial de mestrado, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Mirela Jobim de Azevedo. Em março de 2000, após ser aprovada através de seleção, realizada pelo Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica, UFRGS, passei a aluna regular como bolsista da CAPES.

Durante meu trabalho como aluna de Mestrado implantei a técnica do polimorfismo do gene da glicoproteína PC-1 (K121Q), além de continuar com a genotipagem do polimorfismo do gene da ECA, e colaborei em diversos projetos que ainda estão em andamento:

- *Bases moleculares da Predisposição Genética à Nefropatia Diabética em pacientes com DM tipo 2.* Extração de DNA leucocitário dos pacientes DM tipo 2 e genotipagem dos polimorfismos I/D gene da **ECA** e **M235T** (N=73 pacientes). Responsáveis Dr^a. Luciana Costa e Dr. Jorge Luiz Gross.
- *Perfil lipídico sérico de pacientes com DM tipo 2: Papel da Nefropatia Diabética e Composição Lipídica da Dieta.* Extração de DNA leucocitário e genotipagem do polimorfismo **ECA I/D** (N=32 pacientes). Responsável: Dr. Jorge Luiz Gross
- *Fatores de risco genéticos e não-genéticos para nefropatia diabética em pacientes com DM tipo 2 e proposta de um novo ponto de corte para determinar a presença da nefropatia diabética.* Coleta de sangue e extração de DNA leucocitário e genotipagem dos polimorfismos dos genes **ECA (I/D)** e **PC-1 (K121Q)** (N=52 pacientes). Estudo concluído. Responsável Prof^a. Dr^a. Sandra Pinho Silveiro.
- *Pacientes com DM tipo 2: cardiopatia isquêmica e genotipagens ECA e PC-1 –* (N=99) Coleta de sangue e extração de DNA leucocitário e genotipagem dos polimorfismos dos genes **ECA (I/D)** e **PC-1 (K121Q)** no projeto: Responsável: Prof^a. Dr^a. Mirela Jobim de Azevedo.

- *Estudo dos Fatores de Associação para Retinopatia Diabética Proliferativa em Pacientes com DM tipo 2.* Coleta de sangue e extração de DNA leucocitário e genotipagem dos polimorfismos **ECA I/D** e **PC-1 (K121Q)**. Responsável: Prof^ª. Dra. Mirela Jobim de Azevedo.

Este trabalho é a apresentação dos resultados de um grupo de pacientes DM tipo 1 que fazem parte de um estudo mais amplo, transversal, cujos dados ainda estão em análise. Apresentei o estudo: **“Associação do polimorfismo de inserção/deleção do gene da enzima conversora de angiotensina com anormalidades microvasculares e hemodinâmicas em pacientes com diabetes melito tipo 1: estudo prospectivo de 10 anos”** no 24º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia na qualidade de “Temas Quentes” em dezembro de 2000, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Este trabalho foi selecionado, dentre todos os inscritos no referido Congresso, entre os 12 melhores estudos enviados e também tendo sido apresentado no Congresso da “American Diabetes Association” em junho de 2001, em Dallas, Texas, EUA. Por se tratar de uma coorte com longo tempo de seguimento, acredito estar contribuindo com um trabalho que apresenta um delineamento considerado como ideal para a análise de genes candidatos, onde é possível avaliar progressão e desfechos.

INTRODUÇÃO

Importância e Epidemiologia

A Nefropatia Diabética (ND) é uma complicação crônica que atinge até 40% dos indivíduos com diabetes melito (DM) (1). A ND é a principal causa de morbidade e mortalidade prematura em pacientes com DM tipo 1 (1) e é responsável por cerca de 40% dos casos de insuficiência renal terminal em indivíduos em início de programas de diálise nos Estados Unidos da América (2). Em pacientes com DM tipo 2, está associada a um importante aumento de mortalidade, principalmente por doenças cardiovasculares (3).

Em um estudo de base populacional realizado em 18 centros de hemodiálise da área metropolitana de Porto Alegre, observou-se que 20% dos casos novos de pacientes que ingressavam em programas de hemodiálise eram pacientes diabéticos. A média de sobrevida desses pacientes foi de apenas 26 meses após o início de hemodiálise (4).

A ND é a segunda complicação de maior custo após a doença cardiovascular. O custo do tratamento do diabetes aumenta 65% na presença de nefropatia incipiente, 195% na nefropatia clínica e 771% na insuficiência renal terminal (5).

Considerando esses dados, é de fundamental importância a identificação dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da ND, já que a intervenção precoce

nos pacientes em risco poderia contribuir para evitar a progressão e, talvez, até mesmo o surgimento dessa complicação crônica do DM.

Patogênese e Fatores de Risco

Vários **fatores de risco genéticos e não-genéticos** têm sido implicados no início e na progressão da nefropatia diabética (6,7,8,9).

Fatores Não-Genéticos:

Vários fatores ambientais foram definidos como fatores de risco para a ND. Os mais importantes são:

- ✓ níveis elevados de glicose (10,11);
- ✓ níveis elevados de pressão arterial (12,13,14);
- ✓ hiperfiltração glomerular (15,16);
- ✓ tabagismo (17);
- ✓ hipercolesterolemia (9,12);
- ✓ presença de retinopatia diabética (9, 18);
- ✓ neuropatia autonômica (19);

- ✓ níveis mais elevados de albuminúria ainda dentro dos limites normais (15, 20);
- ✓ aumento da ingestão de proteínas (21).

1. Hiperglicemia

A presença de hiperglicemia é imprescindível para o desenvolvimento de ND (22). A importância da hiperglicemia na instalação da nefropatia está bem documentada no DM tipo 1 e no tipo 2. Os dados do DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) estabeleceram a importância do melhor controle metabólico sobre o desenvolvimento da nefropatia e das outras complicações no DM tipo 1 (10). No UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study), o controle da glicemia diminuiu o surgimento de complicações microvasculares no DM tipo 2, reduzindo significativamente a progressão de normoalbuminúria para microalbuminúria, mas não de micro para macroalbuminúria (11). Outros estudos também demonstraram o benefício do controle glicêmico em pacientes com DM tipo 2 na prevenção das complicações microvasculares (23,24).

2. Hipertensão Arterial Sistêmica

Há fortes evidências de que a hipertensão arterial é um fator de risco importante para o desenvolvimento da ND, como também um fator de progressão (25,26,27). Lafferty e colaboradores analisaram a relação entre pressão arterial (PA) de 24 horas, excreção urinária de albumina (EUA) e neuropatia autonômica em pacientes DM tipo 1 e verificaram que valores de PA aumentados evidenciam sinais subclínicos de neuropatia autonômica antes do desenvolvimento da microalbuminúria persistente e podem ter uma importante implicação no tempo de introdução do tratamento designado para prevenir ou retardar complicações microvasculares em pacientes DM tipo 1 (14). Mogensen e colaboradores, em estudo observacional prospectivo por 3,4 anos, envolvendo 37 pacientes (24 normoalbuminúricos e 13 microalbuminúricos), verificaram que o declínio da taxa de filtração glomerular (TFG) era relacionado aos níveis iniciais mais elevados da pressão arterial sistólica (PAS) (28). A alteração da homeostase pressórica parece ocorrer precocemente em pacientes DM tipo 1 considerados em risco para o desenvolvimento da ND. Pecis e colaboradores observaram que pacientes DM normoalbuminúricos e com hiperfiltração glomerular apresentam menor descenso pressórico noturno quando comparados com pacientes com filtração glomerular normal (29).

3. Hiperfiltração Glomerular

Outro possível marcador de predisposição para a ND é o aumento da TFG. A prevalência de hiperfiltração glomerular em pacientes com DM tipo 1 é de 25% (30,31,32) e em pacientes com DM tipo 2 é de 20 a 40% (33,34). A hipótese hemodinâmica postula que a hiperfiltração glomerular ocasionaria dano direto à parede capilar, além de provocar aumento na passagem de macromoléculas e depósito destas no mesângio. Esses eventos levariam a alterações na permeabilidade da membrana e, posteriormente, ao fechamento capilar glomerular através da glomeruloesclerose. Os capilares menos afetados sofreriam uma hiperfiltração compensatória, fechando um círculo que favoreceria o dano glomerular progressivo (35).

Dois estudos retrospectivos mostraram correlação entre a TFG inicial mais elevada e o subsequente aumento da EUA em pacientes com DM tipo 1 (36,37).

Existem poucos estudos prospectivos que avaliem a hiperfiltração glomerular como fator de risco para ND. Nesses, ou a hiperfiltração foi considerada um fator de risco (38) ou foi um determinante de aumento dos níveis pressóricos ao final do período de acompanhamento (39,40).

Pacientes diabéticos tipo 1 e tipo 2 normoalbuminúricos com hiperfiltração glomerular têm uma redução da TFG ao longo do tempo significativamente maior do que pacientes com TFG normal (15,40,41).

4. Excreção Urinária de Albumina

Níveis de albumina mais elevados, ainda que dentro da faixa de normalidade, também têm sido implicados como marcadores de risco para o desenvolvimento de ND (9,15,42), sugerindo que o ponto de corte empregado atualmente para determinar a progressão de ND talvez deva ser reduzido. Um estudo que revisou e reanalisou recentemente os dados existentes sobre o valor preditivo da microalbuminúria para o desenvolvimento da ND, concluiu que este valor é em torno de 40% para pacientes com DM tipo 1 após 5 ou 6 anos de acompanhamento (43).

5. Retinopatia Diabética

Estudos prospectivos envolvendo pacientes com DM tipo 1 e DM tipo 2 têm demonstrado que a presença de retinopatia no início do acompanhamento está associada ao surgimento futuro de ND (9,40). O aumento da EUA foi relacionada à retinopatia diabética em população de índios Pima (44) e em pacientes com DM tipo 1 (42). Em estudo em que foi analisado uma possível associação entre o polimorfismo I/D do gene da ECA e retinopatia diabética proliferativa em pacientes DM tipo 1, constatou-se que o alelo D confere maior susceptibilidade à RD, independentemente da ND, e que o polimorfismo I/D está associado a maior prevalência de RD proliferativa (18). Porém a maior parte dos estudos (45,46,47,48) não encontraram esta associação.

6. Neuropatia Autonômica

Há evidências de que a neuropatia autonômica possa ter um papel na patogênese da ND (49). A presença de disfunção autonômica em pacientes com DM tipo 1, representada por uma maior atividade simpática durante a noite, associada à elevação da EUA (mesmo que ainda dentro dos níveis de normoalbuminúria), está relacionada à homeostase pressórica anormal e pode representar alterações precoces em pacientes sob risco futuro de desenvolver ND (19).

Fatores genéticos

A existência de uma predisposição genética foi sugerida inicialmente a partir da observação de que apenas uma proporção de pacientes desenvolve a ND (49). Estudos epidemiológicos (1,49) e de agregação familiar da ND (50,51,52,53) confirmaram a associação de fatores genéticos com a ND. Observou-se que os indivíduos diabéticos que não desenvolvem ND nos primeiros 10 a 15 anos após o início do DM, parecem estar protegidos desta complicação (54). Isto sugere que, além dos fatores de risco tradicionais para ND como hiperglicemia crônica - imprescindível para o desenvolvimento de ND, hipertensão arterial (HAS), dislipidemia, tabagismo - exista um componente genético que predispõe o seu desenvolvimento (54).

Estudos de irmãos com DM, tipo 1 e tipo 2, demonstram que a presença de ND em um dos irmãos aumenta o risco de ND no outro irmão em torno de 3 a 4 vezes (55). A magnitude desta associação não pode ser explicada somente pela exposição à fatores

de risco semelhantes, sugerindo a presença do componente genético (56).

A predisposição genética pode estar associada à suscetibilidade à hipertensão arterial (HAS) e doença cardiovascular (DCV) (54,56,57), o que também foi observado em pacientes brasileiros com DM tipo 2 provenientes de uma população geneticamente heterogênea (58). Em recente estudo em que foi analisado morbidade e mortalidade por DCV em pais de pacientes DM tipo 1 com e sem ND, constatou-se que morbidade e mortalidade precoce por DCV são mais freqüentes em pais de pacientes DM tipo 1 com ND quando comparados a pais de pacientes sem ND (59). Os fatores genéticos relacionados a ND são complexos e, provavelmente, envolvem mais de um gene com efeitos aditivos (22).

Duas estratégias têm sido usadas para tentar identificar os possíveis genes envolvidos: a técnica dos genes candidatos e a do *genoma wide scan*.

A técnica dos genes candidatos se baseia nos mecanismos patogénéticos da ND. Podem existir genes que são responsáveis pela instalação da ND e genes responsáveis pela progressão de ND em fases mais avançadas e esses podem ser os mesmos (início e progressão). Em estudos transversais é difícil avaliar a progressão e o desfecho deve estar bem caracterizado. O desenho dos estudos transversais deve ser usado para avaliar o desfecho final já instalado (60).

Vários genes foram analisados como genes candidatos à predisposição à ND, dentre eles genes relacionados à via das enzimas dos polióis, síntese endotelial de óxido nítrico, sistema renina angiotensina e apolipoproteína E (apo E).

Estes estudos têm mostrado resultados contraditórios: em trabalhos investigando o papel da via dos polióis, alguns autores encontraram associação entre o polimorfismo (AC)_n e a ND (61) enquanto outros não (62,63). Nos estudos referentes a síntese endotelial de óxido nítrico não foram encontradas associações entre o polimorfismo G894T e ND (64,65). Numerosos estudos foram realizados envolvendo componentes do sistema renina angiotensina, em especial a enzima conversora de angiotensina (ECA), renina, angiotensinogênio (AGT) e o receptor tipo 1 de angiotensina II (AGTR1) que poderiam estar associados com ND. Os resultados conflitantes destes estudos foram previamente revisados (22,66). De uma maneira geral os polimorfismos destes genes parecem não estar associados ou ter efeitos menores sobre o desenvolvimento de ND. Da mesma maneira, os estudos sobre uma possível associação entre o polimorfismo da apo E e ND também foram inconclusivos (67-74).

A outra estratégia, a do *genoma wide scan*, permite detectar genes que tenham efeito maior ou moderado, usando marcadores genéticos com extensão de 7 a 15 cM no genoma humano. Com o advento da moderna tecnologia, a tarefa de completar uma performance de *genoma scan* tem sido desenvolvida com maior facilidade nos laboratórios de genética. A maior limitação reside na coleta de dados de famílias apropriadas para o estudo *linkage*. Quatro regiões com alguma evidência de ligação com ND foram identificadas nos cromossomas 7, 3, 9 e 20. Entretanto, estudos com famílias de índios Pima diabéticos tipo 2 quando testadas não mostraram evidência de ligação (75).

Gene da ECA

Esse gene foi descrito por Rigat e colaboradores, em 1990 (76). A alteração mais freqüentemente descrita é o polimorfismo associado a presença de um fragmento de Inserção e Deleção (I/D) no intron 16 do gene da ECA localizado no cromossomo 17 (77). O alelo de inserção (I) apresenta um fragmento de 287 pares de base, enquanto que o alelo de deleção (D) não apresenta este fragmento (77) (Figura 1). A associação entre o polimorfismo I/D do gene da ECA e ND têm sido estudada por vários grupos (22,47, 77-89) (Tabela 1). A maior parte desses estudos tem desenho caso-controle e usam variados critérios para definir a presença de ND. Dois, dentre esses estudos, demonstraram associação positiva entre o alelo D e a ND (77,81). Estudos prospectivos mostraram resultados discordantes em pacientes proteinúricos (85,86) e normoalbuminúricos (87,88,89) (Tabela 1). O estudo que testa a transmissão do desequilíbrio (22) observou que o alelo I é mais freqüentemente herdado por pacientes proteinúricos do que normoalbuminúricos. A hiperfiltração glomerular, um possível fator de risco para a ND (38), não tem sido positivamente associada com a presença do alelo D (90,91). No entanto, estes são estudos transversais e em um deles foram incluídos pacientes microalbuminúricos (91) e a ingestão protéica não foi levada em consideração. Apesar destas controvérsias, duas metanálises concluíram que a presença do alelo D está significativamente associada à ND (92,93). Fugisawa e colaboradores (93) analisaram 18 estudos, envolvendo 4773 pacientes com DM tipo 1

e tipo 2. O risco relativo conferido pela presença dessas alterações (polimorfismo) do gene da ECA foi de 1,32 vezes para ND.

Além disso, a presença do alelo D parece ter efeito deletério na evolução de doença renal relacionada ao DM. Em um estudo prospectivo em pacientes DM tipo 1 microalbuminúricos, o alelo D foi associado a um aumento da progressão de glomerulopatia diabética (94), analisadas por biópsia renal.

Apesar de serem escassos os estudos (85,88), existem evidências de que a resposta clínica ao tratamento com os inibidores da ECA varia de acordo com o genótipo da ECA.

Dois estudos avaliando pacientes DM tipo 1 demonstraram que a presença do alelo D está associada a uma pior resposta aos inibidores da ECA. Em estudo longitudinal de Parving e colaboradores, onde foram avaliados 35 pacientes DM tipo 1 macroalbuminúricos (85), observou-se um declínio maior da TFG em pacientes com genótipo DD quando comparados com os pacientes de genótipo II, ambos em tratamento com captopril e concluiu-se que a presença do alelo D reduz o efeito benéfico da terapia com inibidores da ECA na progressão da ND. Em 530 pacientes DM tipo 1 normo/microalbuminúricos (88) em uso de lisinopril, constatou-se que os pacientes com o genótipo II apresentaram menor progressão da excreção urinária de albumina (EUA) (responderam melhor ao tratamento com inibidores da ECA) quando comparados com pacientes ID/DD.

Polimorfismo K121Q do gene do PC-1 em pacientes DM tipo 1

Recentemente, o polimorfismo K121Q, do gene do antígeno plasmático de diferenciação celular (PC-1) foi descrito em pacientes com resistência à insulina (95). Mulheres obesas com DM gestacional apresentaram diminuição da atividade do receptor insulínico e o PC-1 com sua expressão aumentada (96). O PC-1 é uma glicoproteína de membrana que, quando com sua expressão aumentada, inibe a atividade tirosina quinase do receptor insulínico e, subseqüentemente, a resposta celular à insulina (97). Esta inibição pode se dever a interação direta com uma região específica da subunidade α (98) (Figura 2). O polimorfismo K121Q está no exon 4 do cromossomo 6 do gene PC-1 (95). A presença do alelo Q tem sido associada a um aumento de risco para resistência insulínica/hiperinsulinemia (95). A presença de resistência insulínica parece ser uma característica de pacientes DM tipo 1 microalbuminúricos (99).

A presença do alelo Q (KQ/QQ) foi associada a um maior declínio da TFG em pacientes diabéticos tipo 1 com nefropatia clínica (100). No entanto, pesquisadores dinamarqueses não encontraram associação do alelo Q com a presença de complicações microvasculares também em pacientes com DM tipo 1 (101) (Tabela 1). Da mesma forma, em pacientes com DM tipo 2 e pacientes com tolerância alterada à glicose, não foi constatada associação entre o polimorfismo K121Q e a resistência à insulina (102).

Não existem dados sobre o polimorfismo PC-1 antes do estabelecimento da ND.

A possível interação entre os polimorfismos dos genes da ECA e do PC-1 com TFG, EUA, pressão arterial (PA) não foram avaliadas em estudos prospectivos antes do estabelecimento de micro ou macroalbuminúria em pacientes com DM tipo 1.

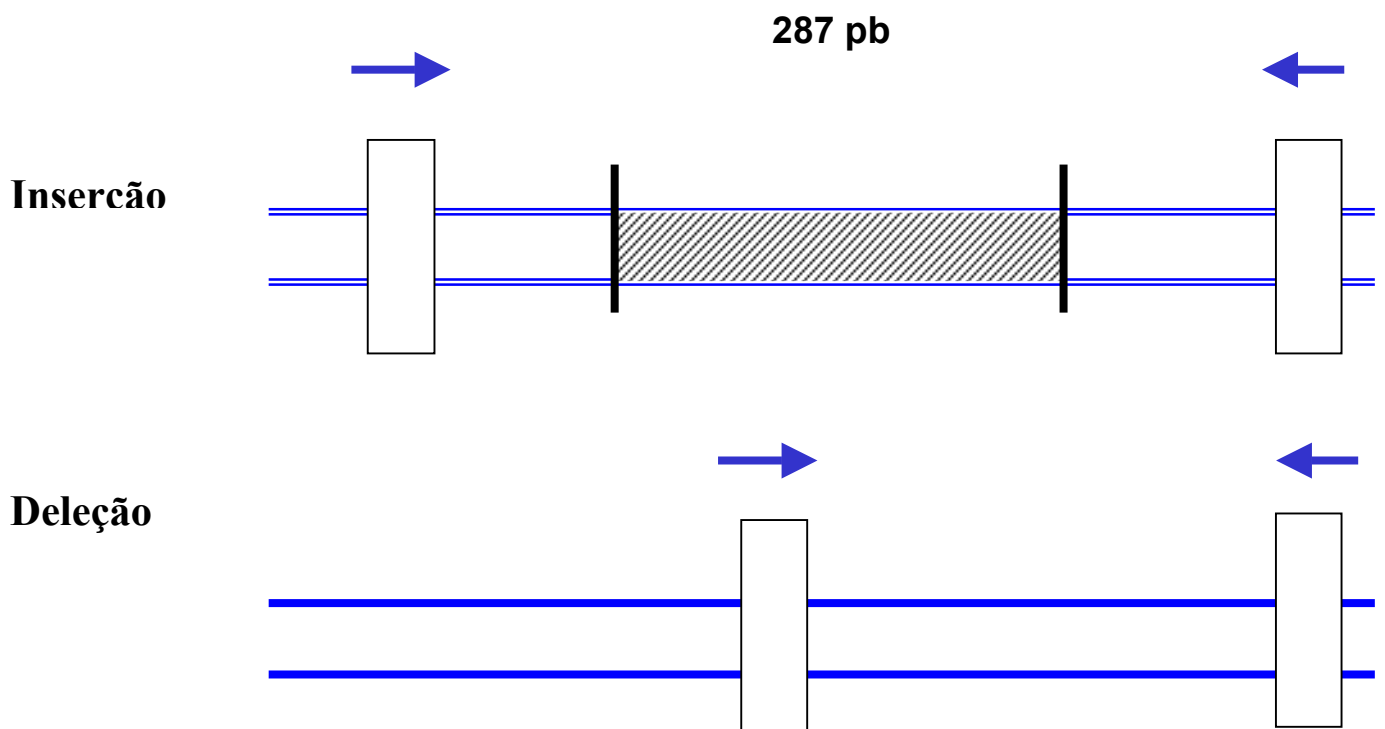


Figura 1 - O alelo de inserção (I) apresenta um fragmento adicional de 287 pares de base enquanto que o alelo de deleção (D) não apresenta este fragmento (76).

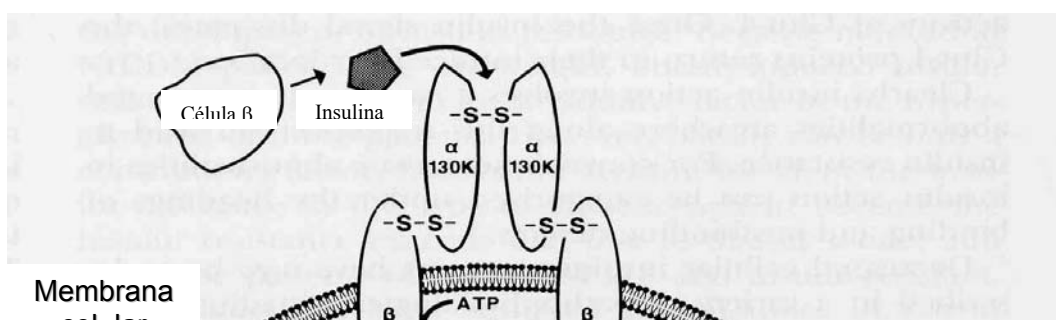


Figura 2 – Receptor insulínico. O receptor insulínico é uma proteína heterotetrâmica composta por duas sub-unidades α (extracelular – responsável pela ligação da insulina) e duas sub-unidades β idênticas ligadas covalentemente por ligações dissulfetos. O PC-1 é uma glicoproteína de membrana que, quando com sua expressão aumentada, inibe a atividade tirosina quinase do receptor insulínico e, subseqüentemente, a resposta celular à insulina. (97). Esta inibição pode se dever a interação direta com uma região específica da subunidade α (98).

Tabela 1 - Estudos dos polimorfismos dos genes da ECA e PC-1 e nefropatia diabética em pacientes com diabetes melito tipo 1

Autor	N	Desenho	ND definida como	Gene	Alelo de Risco
Schmidt e col., 1995 ⁽⁷⁸⁾	247	Caso-controle	Microalbuminúria, proteinúria e ESRD	ECA	Nenhum

Tarnow e col., 1995 ⁽⁴⁷⁾	390	Caso-controle	Proteinúria	ECA	Nenhum
Chowdhury e col., 1996 ⁽⁷⁹⁾	583	Caso-controle	Proteinúria	ECA	Nenhum
Hibberd e col., 1997 ⁽⁸⁰⁾	249	Caso-controle	Proteinúria	ECA	Nenhum
Marre e col., 1997 ⁽⁷⁷⁾	494	Caso-controle	Microalbuminúria, proteinúria e ESRD	ECA	alelo D
Barnas e col., 1997 ⁽⁸¹⁾	122	Caso-controle	Microalbuminúria e proteinúria	ECA	genótipo DD
Ringel e col., 1997 ⁽⁸²⁾	360	Caso-controle	Microalbuminúria and proteinúria	ECA	Nenhum
DeCosmo e col., 1999 ⁽⁸³⁾	311	Caso-controle	Microalbuminúria e proteinúria	ECA	Nenhum
Ittersum e col., 2000 ⁽⁸⁴⁾	248	Caso-controle	Microalbuminúria e proteinúria	ECA	Nenhum
Parving e col., 1996 ⁽⁸⁵⁾	35	Coorte	Declínio TFG em pacientes proteinúricos	ECA	genótipo DD
Bjorck e col., 1997 ⁽⁸⁶⁾	86	Coorte	Declínio TFG em pacientes proteinúricos	ECA	Nenhum
Powrie e col., 1994 ⁽⁸⁷⁾	97	Coorte	Microalbuminúria	ECA	Nenhum
Penno e col., 1998 ⁽⁸⁸⁾	501	Coorte	Aumento EUA em pacientes normoalbuminúricos	ECA	genótipo II
Hadjadj e col., 2001 ⁽⁸⁹⁾	310	Coorte	Microalbuminúria	ECA	alelo D
Krolewski, 1999 ⁽²²⁾	267	TDT	Proteinúria	ECA	alelo I
De Cosmo e col., 2000 ⁽¹⁰⁰⁾	77	Coorte	Declínio TFG em pacientes proteinúricos	PC-1	alelo Q
Tarnow e col., 2001 ⁽¹⁰¹⁾	391	Caso-controle	Proteinúria	PC-1	Nenhum

TDT: *transmission disequilibrium test*

OBJETIVO

Analisar o papel dos polimorfismos dos genes da ECA (I/D) e do PC-1 (K121Q) nas modificações da TFG, EUA, pressão arterial e no desenvolvimento de complicações microvasculares associadas ao DM em uma coorte de pacientes DM1 normoalbuminúricos e normotensos.

PACIENTES E MÉTODOS

Delineamento do Estudo

Foi realizado um estudo de coorte observacional em pacientes com DM tipo 1 normoalbuminúricos e normotensos.

Os pacientes foram avaliados no início do estudo e, após, periodicamente. As avaliações realizadas constaram de:

- ❖ Exame clínico
- ❖ Medida de EUA
- ❖ Níveis de pressão arterial sistêmica
- ❖ Medida de TFG
- ❖ Índices de controle metabólico
- ❖ Presença de retinopatia, vasculopatia periférica, neuropatia periférica e neuropatia autonômica diabéticas.

Pacientes

Este foi um estudo prospectivo de $10,2 \pm 2,0$ anos (6,5 a 13,3 anos) de acompanhamento de uma coorte de pacientes DM tipo 1 atendidos no Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que preencheram os critérios de inclusão pré-estabelecidos e que concordaram em participar do estudo. Os pacientes preencheram um termo de consentimento (Apêndice 1) e o protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os pacientes ingressaram no estudo em dois períodos: de 1986 a 1989 (n=20) e de 1990 a 1992 (n=13). No presente estudo foram avaliados 30 pacientes: 13 mulheres e 17 homens, com idade de $32,2 \pm 6,6$ anos (22,4 - 48,7), índice de massa corporal (IMC) $22,2 \pm 2,5$ Kg/m² (15,9 – 29,6) e duração de diabetes de $6,8 \pm 4,7$ anos (1,5 – 24,2). Estes dados são relativos ao período inicial do estudo.

O diagnóstico de DM tipo 1 foi estabelecido de acordo com os seguintes critérios:

- ❖ início do quadro antes dos 40 anos de idade;
- ❖ apresentação de pelo menos um episódio de cetoacidose diabética e/ou cetonemia;
- ❖ necessidade inequívoca do uso de insulina para a manutenção da vida dentro de 5 anos após o diagnóstico de DM; (107)

Os critérios de seleção adotados no início do período de acompanhamento foram:

Critérios de Inclusão:

Para o ingresso no estudo, foram definidos os seguintes critérios: duração do DM maior do que de 1 ano, idade superior a 18 anos, EUA < 20µg/min (em pelo menos duas ocasiões diferentes, em urina estéril, com 3 meses de intervalo) (104), pressão arterial sistêmica < 140/90 mmHg (em pelo menos duas aferições) (105,106).

Critérios de Exclusão:

Foram excluídos os pacientes com história ou evidência de cardiopatia isquêmica, avaliada em teste ergométrico, doença renal de qualquer natureza, alcoolismo ou obesidade (definida como a presença de $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$) (107), gestação e neuropatia autonômica (2 ou mais de 5 testes autonômicos cardiovasculares anormais) (108).

Três pacientes foram excluídos da coorte original (n=33) porque não puderam ter seu genótipo determinado: um paciente morreu de cetoacidose diabética após 6 anos de acompanhamento, outro por acidente de trânsito após 11 anos de acompanhamento e o terceiro mudou de endereço após 10,3 anos de acompanhamento e não foi localizado.

Cada paciente foi avaliado 6,7 vezes (2 a 12 vezes). Com exceção de uma paciente (MP), todos foram examinados mais de duas vezes. Durante o período de acompanhamento dos pacientes, o atendimento médico foi realizado apenas pelos pesquisadores envolvidos (M.J.A, J.L.G., M.P., M.L.A.C.).

Inicialmente, os pacientes foram submetidos a uma avaliação clínica que incluiu anamnese [presença de tabagismo atual ou passado (1 ou mais cigarros/dia por 6 meses), presença de história familiar de hipertensão arterial sistêmica (HAS), de DM e de nefropatia diabética em familiares de 1º grau (pai, mãe, irmãos)], exame físico completo, medida de pressão arterial, fundoscopia direta sob midríase, palpação de pulsos periféricos, exame neurológico periférico e testes cardiovasculares autonômicos. Foram também realizadas medidas de TFG, albuminúria em urina de 24 horas (pelo menos 2 de 3 medidas em urina estéril) e uma avaliação laboratorial básica

com a medição de glicemia jejum, glico-hemoglobina, frutossamina, colesterol, triglicerídeos, uréia, creatinina, hemograma, exame qualitativo de urina, urocultura e medida em urina de 24 horas de creatinina, uréia, albumina e sódio.

Os pacientes foram orientados quanto à dieta, de acordo com as recomendações da Associação Americana de Diabetes (109). Todos os pacientes realizaram revisões médicas periódicas e monitorização domiciliar da glicemia capilar a intervalos variáveis. Quando era detectado um período de mau controle glicêmico, eram pesquisadas as possíveis causas de descompensação, intensificada a automonitorização domiciliar de glicemia capilar e realizados os ajustes necessários nas doses de insulina. Durante o estudo, além das revisões médicas periódicas, os pacientes foram submetidos a mesma avaliação clínica e laboratorial do início do estudo com um intervalo médio de $1,7 \pm 0,6$ anos (1,0 a 4,2). Estas avaliações foram realizadas em períodos de razoável controle glicêmico (glicemia de jejum $<200\text{mg/dl}$).

Avaliação clínica e definições de desfechos

Medida de Pressão Arterial - A pressão arterial foi medida na posição sentada, após 10 minutos de repouso, com esfigmomanômetro de coluna de mercúrio, manguito 25×12 cm, nas fases I e V de Korotkoff, sendo as leituras feitas o mais próximo da marcação de 2mmHg na escala (105). A pressão arterial média (PAM) foi calculada através da fórmula: $[\text{pressão arterial diastólica (PAD)} \times 2 + \text{pressão arterial sistólica (PAS)}] / 3$. Foi utilizada a média de 2 aferições. Os pacientes foram

considerados portadores de hipertensão arterial sistêmica quando os níveis de pressão arterial foram maiores do que 140/90 mmHg em pelo menos duas ocasiões diferentes.

Medida da Taxa de Filtração Glomerular - De acordo com as medidas da TFG, os pacientes foram classificados em hiperfiltrantes ($TFG \geq 134 \text{ ml/min/1,73 m}^2$) ou normofiltrantes ($TFG < 134 \text{ ml/min/1,73 m}^2$) (114, 115). Esta classificação foi baseada em pelo menos 2 medidas de TFG em certo intervalo de tempo (1 a 2 meses), sendo utilizada para o estudo apenas a primeira medida. Somente foram consideradas as medidas de FG realizadas quando a glicemia de jejum, coletada no início do exame, foi inferior ou igual a 200 mg/dl.

Medida de EUA – A dosagem de albumina urinária foi realizada em urina de 24 horas estéril (urocultura negativa). Antes de 1997 a EUA foi determinada através de radioimunoensaio (DPC). Após passou a ser utilizada a imunoturbidimetria. O coeficiente de correlação entre os 2 métodos em nossa unidade é de 0,98 (112). Os pacientes foram orientados verbalmente e receberam instruções por escrito para que anotassem o horário exato (horas e minutos) da primeira urina da manhã (urina desprezada: início da coleta) e para que coletassem toda a urina das próximas micções, até a primeira urina do dia subsequente, anotando novamente o horário (urina incluída: término da coleta). Os indivíduos com $EUA < 20 \mu\text{g/min}$ foram considerados normoalbuminúricos, EUA entre 20 e $200 \mu\text{g/min}$ microalbuminúricos e pacientes com

EUA > 200µg/min macroalbuminúricos em pelo menos duas de três amostras de urina estéril de 24 horas.

Avaliação oftalmológica - A presença de retinopatia diabética foi avaliada pelos pesquisadores através de exame oftalmoscópio direto sob midríase e confirmada por um mesmo oftalmologista. A classificação utilizada foi: 1) sem sinais de retinopatia diabética 2) retinopatia diabética não proliferativa leve (microaneurismas mais hemorragias retinianas leves a moderados ou exsudatos duros); 3) retinopatia diabética não proliferativa moderada (microaneurismas mais quaisquer um dos seguintes achados: exsudatos algodinosos, anormalidades intraretianas microvasculares leves ou dilatações venosas, ou hemorragias retinianas severas) ou 4) retinopatia diabética proliferativa.

Foi analisada a presença de retinopatia (itens 2,3 e 4) bem como a progressão de um estágio a outro.

Métodos

1. Análise dos polimorfismos genéticos

As análises dos polimorfismos foram feitas em duplicata (duas ampliações) e sempre pelo pesquisador responsável (CAD), sendo este cego para os resultados das avaliações clínicas realizadas.

Extração do DNA

A análise do DNA foi realizada através da extração do DNA de leucócitos coletados de 10 mL sangue periférico, através da técnica padrão. Resumidamente, ao sangue total extraído foi acrescentado 45 mL de água estéril gelada, para lise das hemácias com posterior centrifugação (20 min. 4000 rpm). A seguir, o sobrenadante é descartado e ao sedimento é adicionado 25 mL de solução 0,1% de Triton X-100 e nova centrifugação por mais 20 minutos. Logo após, descarta-se novamente o sobrenadante e adiciona-se ao sedimento 3 mL de tampão lise nuclear (*Nucleolysis* 1x), agita-se e acrescenta-se 120µl de proteinase K (10mg/ml em tampão) e 200µl de SDS 10%. Esse material é incubado a 55°C durante 1 hora ou 37°C , 12 –14 horas. Sequencialmente adiciona-se 1 mL de solução de acetato de amônio 9,6M, agita-se no vortex por 15 segundos e repousa-se a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos. Esse material é então centrifugado por 20 minutos a 4000 rpm para posterior adição de 10 mL de etanol absoluto. Misturando-se levemente o conteúdo para, finalmente, “pescar” o DNA com tubo capilar para micro-hematócrito, colocar em tubos *ependorfs* estéreis e ressusender em 200 a 300µL de TE. O DNA extraído foi quantificado e posteriormente armazenado a menos 20° C até a análise molecular.

Análise do Polimorfismo I/D do gene da ECA:

O polimorfismo do gene da ECA (I/D) – localizado no cromossomo 17- foi identificado através da amplificação do segmento do intron 16 através da técnica da

reação da polimerase em cadeia (PCR) e a identificação dos fragmentos amplificados através de gel de agarose 1-2% (77). Os “primers” utilizados na reação de PCR foram GIIS: 5’ CTC AAG CACG CCC CTC ACA GGA CTG 3’ e GAS: 5’ GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA 3’ (77). A PCR foi realizada a partir de 100ng de DNA genômico, 20 mM tris (pH 8,4), 0,2 mM de dNTP, 400-pM de cada primer, 2mM MgCl₂ e 1U de *Taq DNA polimerase* em 50µL de solução final. Os ciclos foram realizados em um termociclador automático (MJ Research) com um período de desnaturação de 1 minuto a 94°C, 34 ciclos de amplificação (95°C 1 minuto, 62°C 1 minuto, 72°C 1 minuto) e um período de extensão final de 5 minutos a 72°C. A presença do alelo de inserção (I) resulta em um fragmento de 561 pb e a presença do alelo em deleção (D) de um fragmento de 274 pb (77). Falsas amplificações do alelo D procuraram ser evitadas com a adição do dimetilsulfóxido (DMSO) 5% na reação de PCR (113) e todos os pacientes com o genótipo DD tiveram seu resultado confirmado através de novo PCR com primer interno (5’ ATC ACG AGG TCA GGA GAT CGA GAC 3’), correspondente à região do fragmento de inserção (81).

Análise do Polimorfismo K121Q do gene PC-1:

O polimorfismo do gene do PC-1 (K121Q) – localizado no cromossomo 6 - foi identificado através da amplificação do segmento no exon 4 através da PCR seguida de digestão enzimática com a endonuclease de restrição *Ava II* e a identificação dos fragmentos digeridos através de gel de agarose 3% (95). Os “primers” utilizados na reação de PCR foram 4Fw: 5’ CTG TGTTCACTTTGGACATGTTG 3’ e 4Rv: 5’

GAC GTT GGA AGA TAC CAG GTT TG 3' (95). A reação de PCR foi realizada a partir de 100ng de DNA genômico, 20 mM tris (pH 8,4), 0,2 mM de dNTP, 50pM de cada "primer", 2mM MgCl₂ e 1U de *Taq DNA polimerase* em 50µL de solução final. Os ciclos foram realizados em um termociclador automático (MJ Research) com um período de desnaturação de 1 minuto a 94 C, 34 ciclos de amplifica o (95 C 1 minuto, 60 C 1 minuto, 72 C 1 minuto) e um período de extensão de 5 minutos a 72 C. A presença do alelo K resultou em um fragmento de 238 pares de base e a presença do alelo Q de fragmentos de 148 e 90 pares de base (95).

Os pacientes foram divididos em grupos de acordo com o genótipo observado nos polimorfismos da ECA e do PC-1, sendo considerados para o agrupamento a presença do alelo D e do alelo Q .

1. Avalia o da fun o renal:

Taxa de Filtra o Glomerular - A medida da TFG foi realizada através da técnica da inje o única do 51Cr-EDTA (5,55 MBq), segundo Chantler e Barrat (114), com coletas de sangue venoso nos tempos 0,120,180 e 240 minutos, conforme padronizado previamente. O coeficiente de varia o (CV) intra-individual médio do método   de 11,2% (110,115).

Excreção Urinária de Albumina – Até 1997, a EUA era determinada por radioimunoensaio (DPC, Los Angeles, CA, USA, CV inter e intra-ensaio = 2,3 e 2,8%, respectivamente). Após a albuminúria passou a ser medida por imunoturbidimetria (Microlab – AMES; CV intra e inter-ensaio: 4,5 e 11,0%, respectivamente). O coeficiente de correlação entre os dois métodos foi de 0,98 em nosso laboratório (112).

2. Avaliação de controle metabólico e outras medidas

A glico-hemoglobina (HbA_{1c}) foi medida por método de cromatografia de troca de iônica em micro-colunas (Labtest Sistemas para Diagnósticos; valores de referência de 5,3 a 8,0%; CV intra-ensaio 4,1 a 5,8%) (116) e, após 1998, as dosagens foram realizadas por cromatografia de alta precisão HPLC [high performance liquid chromatography (em aparelho Merck-Hitachi L9100; valores de referência: 2,7 – 4,3%)] (117). Para a comparação entre os valores finais e iniciais, os valores finais de HbA_{1c} medidos por HPLC, foram convertidos para valores estimados de cromatografia de troca de iônica em micro-colunas através da fórmula $y = 1,09x + 1,95$ de acordo com Camargo e col. (122). Para obter o valor médio de HbA_{1c} durante o estudo os valores foram também convertidos, quando necessário, para troca iônica, para a realização da média da HbA_{1c}.

A glicose sérica foi medida pelo método enzimático colorimétrico glicose-peroxidase – Kit biodiagnóstica (123), colesterol total, HDL - colesterol e triglicerídeos pelo método enzimático colorimétrico (120,121,122), a creatinina sérica

através do método de Jaffé (123) e sódio (124) por fotometria de chama, frutossamina pelo método colorimétrico através da redução de NBT – Kit Labtest (125). A uréia urinária foi medida pelo método enzimático U.V., usando-se “kit” comercial Labtest Sistemas para Diagnósticos (126).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre as características dos grupos foi analisada pelo teste exato de Fisher ou qui-quadrado (variáveis qualitativas) e pelo teste *t* de Student não pareado. Comparações entre o início e o final do estudo foram analisadas pelo teste *t* pareado, qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Na avaliação das modificações da EUA, TFG e PAM através do tempo, foi determinada a regressão linear ($y = a + bx$) de cada paciente, para cada uma das 3 variáveis, e então, calculada a média das declividades (*b*). Estes valores foram considerados como a alteração das variáveis ao longo do período de acompanhamento. Para a EUA o resultado foi expresso em $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mês}$, para a TFG em $\text{mL}/\text{min}/\text{mês}$ e para a PAM em $\text{mmHg}/\text{mês}$. A significância destas modificações (*b*EUA, *b*TFG e *b*PAM) foi analisada por teste *t* contra uma amostra (“one sample *t* test”).

Foram realizadas análises de Regressão Linear Múltipla (método “backward”), usando as modificações da TFG (*b* TFG), modificação da EUA (*b* log EUA) e TFG inicial, como variáveis dependentes. Análises de Regressão Logística Múltipla foram usadas para determinar os fatores de risco para o desenvolvimento de retinopatia diabética (aparecimento ou progressão) e de HAS ao final do estudo. A escolha das

variáveis independentes nas análises de regressão múltipla foi baseada nos resultados da análise univariada e em possíveis fatores com importância biológica em relação à variável dependente analisada.

Os valores da EUA sofreram transformação logarítmica para serem submetidos à análise estatística.

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ou como mediana e variação (valores mínimo e máximo) para os valores da EUA. Foram utilizados testes bicaudais e o nível de significância foi de 5%. Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico “Statistical Package for Social Sciences – Professional StatisticsTM” 7.5.

RESULTADOS

I - Modificações nos parâmetros da função renal, níveis de pressão arterial e desenvolvimento de complicações microvasculares

Três novos casos de ND (microalbuminúria em 2 pacientes e macroalbuminúria em 1 paciente) foram observados durante o estudo. O paciente com macroalbuminúria permaneceu normotenso durante o estudo, tendo sido prescrito inibidor da ECA após 7,1 anos de acompanhamento. Este paciente foi acompanhado por um período de 9,5 anos. Um dos pacientes microalbuminúricos se tornou hipertenso e começou a ser tratado com inibidor da ECA depois de 10,8 anos de acompanhamento. O outro paciente microalbuminúrico ainda era normotenso quando desenvolveu microalbuminúria no final do estudo, após 13 anos de seguimento.

Os valores basais de HbA₁C ($9,3 \pm 1,6\%$) não foram diferentes dos valores ao final do estudo ($9,6 \pm 1,9\%$; $P = 0,481$). A uréia urinária também permaneceu inalterada durante o estudo (valores iniciais: $20,1 \pm 8,7$ g/24h; valores finais: $22,7 \pm 5,8$ g/24h; $P = 0,148$).

Os determinantes dos valores iniciais de TFG foram analisados em análise de regressão linear múltipla com as seguintes variáveis independentes: valores de HbA₁C e de proteína ingerida no início do estudo, de presença do alelo D e presença do alelo Q. A ingestão protéica basal foi avaliada através da medida de uréia urinária em 24

horas. Somente a HbA₁C inicial permaneceu significativamente associada com os valores basais de TFG ($R^2 = 0,15$; $F = 4,96$; $P = 0,034$).

Durante o estudo houve um declínio da taxa da TFG ($bTFG = -0,29 \pm 0,34$ ml/min/mês; $P < 0,0001$), assim como um aumento da EUA ($b\logEUA = 0,0275 \pm 0,042$ $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mês}$; $P = 0,002$). Quando os 3 pacientes que desenvolveram ND foram excluídos destas análises, as modificações observadas na TFG e na EUA permaneceram significativas.

Na análise de regressão linear múltipla com a modificação da TFG durante o estudo ($bTFG$) como variável dependente, a TFG, pressão arterial média e log EUA basais, média da HbA₁C durante o estudo, polimorfismo do gene da ECA (presença ou ausência do alelo D) e gene PC-1 (presença ou ausência do alelo Q) como variáveis independentes, somente a presença do alelo D permaneceu no modelo, sendo responsável por 15% da redução observada na TFG [$R^2 = 0,15$; $F = 4,92$; $P = 0,035$; resultante do modelo: modificação da taxa de FG = $-0,0117 - 0,269 \times$ polimorfismo ECA (ausência do alelo D = 0; presença do alelo D = 1)]. A média da redução de TFG para os pacientes com genótipo II foi de 0,117 ml/min/mês e para os pacientes com os genótipos ID ou DD a média da redução foi de 0,390 ml/min/mês (Figura 3).

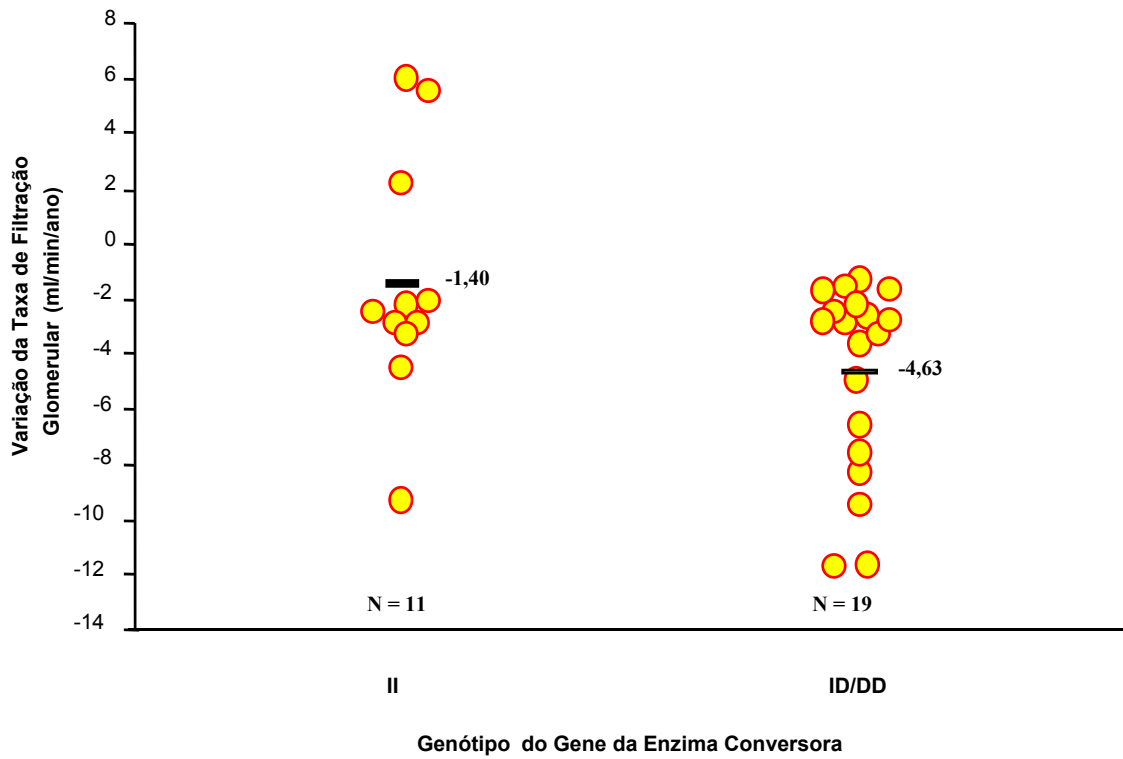


Figura 3: Variação Anual da Taxa de Filtração Glomerular em Pacientes com Diabete Melito Tipo 1 Normoalbuminúricos e Normotensos

Quando a modificação da EUA foi analisada como variável dependente, somente os valores iniciais de EUA (logEUA basal) foram preditivos do aumento observado nos níveis de EUA ($R^2 = 0,10$; $F = 3,12$; $P = 0,08$). A TFG e PAM iniciais, HbA₁C média e os polimorfismos da ECA e PC-1 foram excluídos deste modelo.

Nove pacientes tornaram-se hipertensos durante este estudo. Cinco pacientes foram tratados com medidas não farmacológicas e 4 pacientes com agentes anti-hipertensivos (captopril em 1 paciente microalbuminúrico e propranolol nos outros). Nestes 4 pacientes que foram acompanhados por 9,4 anos (5,5 – 13,3 anos) o tratamento medicamentoso foi iniciado em média após 7,4 anos (4,8 – 10,8) de acompanhamento. Os níveis de pressão arterial não se modificaram durante o estudo nos pacientes que não desenvolveram hipertensão arterial. Os fatores de risco para o desenvolvimento de HAS, analisados em regressão logística múltipla, foram idade: (OR: 1,07; IC 95%: 1,01-1,14; $P=0,04$) e TFG (OR: 1,09; IC 95%: 0,99 -1,20; $P=0,078$) iniciais. A presença dos alelos D e Q foram excluídas do modelo.

Onze novos casos de retinopatia diabética foram observados durante o estudo (10 novos casos de retinopatia diabética não proliferativa leve e 1 caso de retinopatia diabética proliferativa). Em uma análise de regressão logística múltipla o único fator de risco associado ao desenvolvimento de retinopatia foi a presença de HAS ao final do estudo (OR: 14,87; IC 95%: 2,19 – 100,65; $P=0,006$). A presença dos alelos D e Q, duração de DM ao final do estudo e HbA₁C média foram excluídos deste modelo.

II - Características dos pacientes agrupados de acordo com o polimorfismo I/D do gene da ECA

A distribuição dos genótipos da ECA encontrados nesta coorte de 30 pacientes DM tipo 1 normoalbuminúricos foi: 12 pacientes ID, 7 pacientes DD e 11 pacientes II. A frequência do alelo I foi de 0,57 e do alelo D de 0,43. A distribuição observada dos genótipos está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P = 0,596$).

A classificação por PCR dos genótipos em II, ID e DD em gel de agarose a 2% está exemplificada na Figura 4. Na coluna 1 está o marcador de 100pb. Observa-se a amplificação dos fragmentos I de 561pb e D de 274pb. Um indivíduo homocigoto II está representado na coluna 2, na coluna 3 um indivíduo ID e na coluna 4 um indivíduo DD.

A Figura 5 mostra a verificação do genótipo DD usando o 3º oligonucleotídeo FYM. Na coluna 1 está o marcador de 100pb. Nas colunas 2 a 4 observam-se os indivíduos DD (sem amplificação), na coluna 5 o controle negativo e nas colunas 6 e 7 a amplificação do fragmento de 376pb no indivíduo controle com pelo menos um alelo I (neste caso pacientes ID).

De acordo com a presença do alelo D os pacientes foram divididos em 2 grupos: grupo II ($n=11$) e grupo ID ou DD (ID/DD $n=19$). Na Tabela 2 estão descritas as características clínicas dos pacientes no início do estudo de acordo com esta divisão. Não foi observada diferença entre os grupos em relação à idade, proporção de sexos, duração de DM e IMC.

As características no início e final do estudo dos pacientes II e ID/DD estão expostas na Tabela 3. No início do estudo os valores de HbA₁C, uréia urinária, PAM, presença de retinopatia e valores de TFG e EUA não foram diferentes entre os dois grupos. Os valores de HbA₁C não modificaram-se durante o estudo nos pacientes I, mas diminuíram nos pacientes ID/DD. Contudo, a média dos valores de HbA₁C calculado durante o período do seguimento, não foi diferente entre o grupo II (9,2 ±1,4%) e o grupo ID/DD (9,0 ±1,2%; P>0,05). Ao final do estudo, a quantidade de proteína ingerida, estimada pela excreção de uréia urinária em 24h, não se modificou nos grupos II ou ID/DD.

Os 3 pacientes que desenvolveram ND pertenciam ao grupo ID/DD. Ao final do estudo os níveis de EUA aumentaram somente nos pacientes ID/DD. Quando os 3 pacientes com ND foram excluídos da análise este aumento persistiu, embora com significância limítrofe (P = 0,07). As modificações na EUA foram similares nos grupos II e ID/DD (II: log EUA 0,0198 µg/min/mês; ID/DD: log EUA 0,0320 µg/min/mês). O declínio dos valores da TFG ao final do estudo foi observado somente em pacientes com os genótipos ID/DD. Estes pacientes apresentaram declínio mais rápido (P = 0,035) da TFG (-0,39 ± 0,29 ml/min/mês) quando comparados com os pacientes com genótipo II (-0,12 ± 0,37 ml/min/mês). Na Figura 3 estes dados estão expressos como variação da TFG anual.

Dois pacientes II e 7 pacientes ID/DD se tornaram hipertensos durante o estudo. O aumento na proporção de pacientes hipertensos foi significativo somente no grupo ID/DD (P = 0,01). Embora a PAM no final do estudo tenha aumentado somente nos

pacientes II , as modificações nos valores de PAM (II: $0,10 \pm 0,48$ mmHg/mês; DD: $0,11 \pm 0,54$ mmHg/mês) não foram diferentes entre 2 os grupos. Entretanto, os pacientes ID/DD foram mais frequentemente tratados com agentes anti-hipertensivos (4/7) do que os pacientes II (0/2).

No final do estudo 4 novos casos de retinopatia diabética foram observados no grupo de 11 pacientes II e 7 novos casos no grupo de 19 pacientes ID/DD. Entretanto o aumento da proporção de pacientes afetados foi significativo somente no grupo ID/DD ($P = 0,04$).

Quatro pacientes desenvolveram neuropatia autonômica e todos eles pertenciam ao grupo do ID/DD, porém este aumento não foi significativo.

Nenhum paciente desenvolveu doença vascular periférica durante o período do acompanhamento.

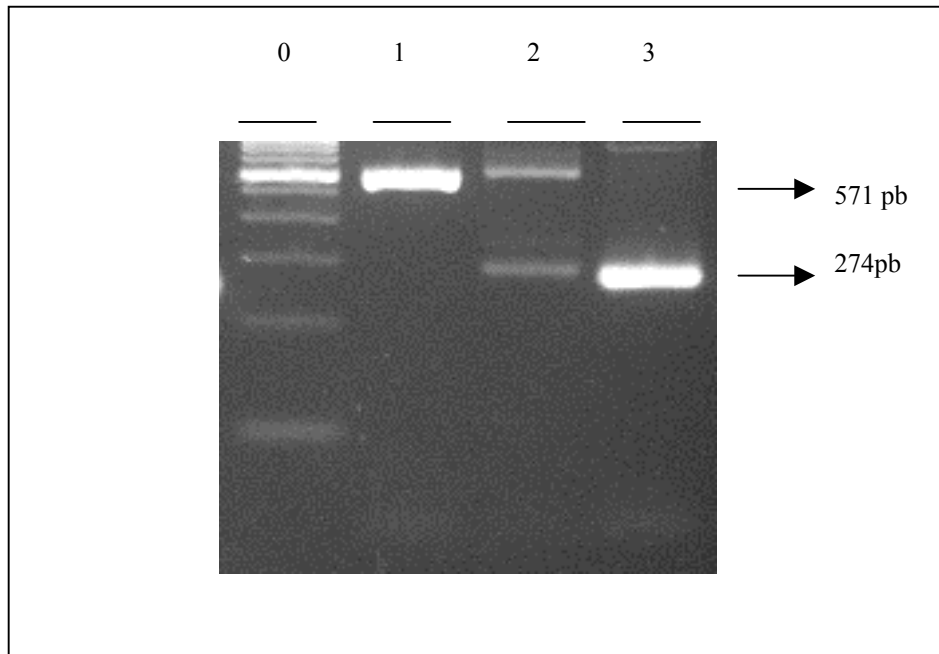


Figura 4. Gel de agarose a 2% ilustrativo da utilização diagnóstica por amplificação por PCR do polimorfismo I/D do gene da ECA: identificação dos genótipos. Coluna O: marcador de 100pb. Indivíduo 1 é II enquanto o indivíduo 2 é ID e o indivíduo 3 é DD.

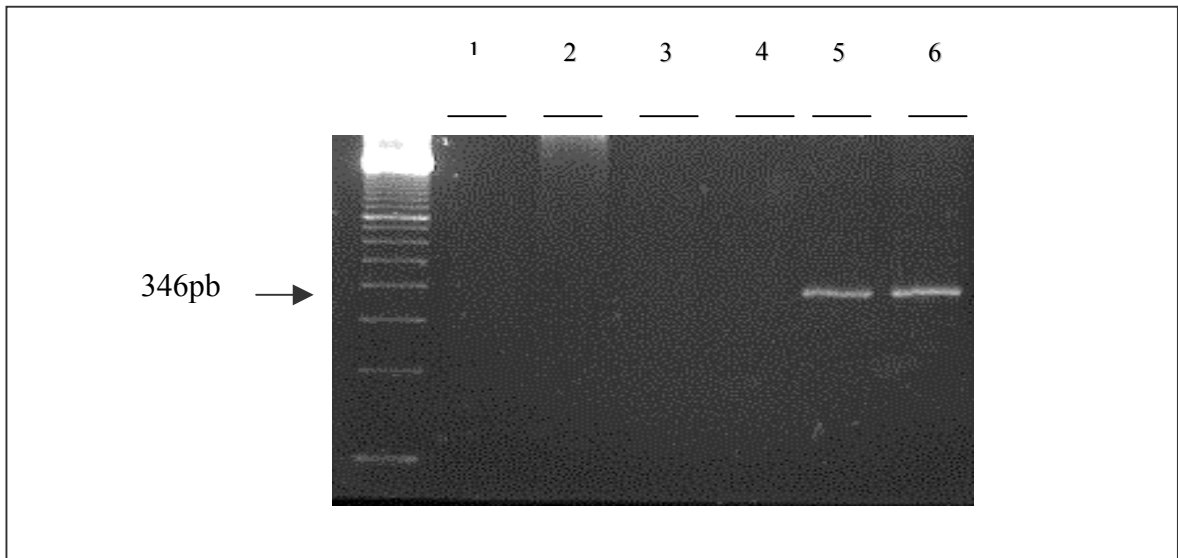


Figura 5. Gel de agarose a 2% ilustrativo da utilização diagnóstica por amplificação por PCR da confirmação de genótipos DD do polimorfismo do gene da ECA utilizando oligonucleotídeo FYN. Nos indivíduos de 1 a 3 confirma-se o genótipo DD (não há amplificação), coluna 4: controle negativo e indivíduos 5 e 6 genótipos ID usados como controle da reação.

Tabela 2 – Características no início do estudo dos pacientes DM tipo 1 de acordo com o genótipo da ECA

	GENÓTIPO II	GENÓTIPO ID/DD	P
N	11	19	-
Idade (anos)	30,5 ± 5,8	33,2 ± 7,3	0,29
Sexo (masculino)	5	12	0,89
Duração de DM	7,0 ± 6,0	6,6 ± 4,0	0,82
IMC (kg/m ²)	21,7 ± 1,7	22,5 ± 2,8	0,38

Dados expressos como média desvio padrão (variação) ou número de indivíduos com a característica estudada

DM: diabete melito

IMC: índice de massa corporal

Tabela 3 – Características no início e final do estudo dos pacientes DM tipo 1 agrupados de acordo com o genótipo da ECA

	GENÓTIPO II		GENÓTIPOS ID/DD	
	INÍCIO	FINAL	INÍCIO	FINAL
Glicohemoglobina (%)	9,0 ± 1,8	10,0 ± 1,8	9,9 ± 1,9	8,9 ± 1,4*
Uréia urinária (g/24h)	19,0 ± 5,1	21,0 ± 6,4	20,9 ± 10,6	23,8 ± 5,2
Nefropatia Diabética (sim)	0	0	0	3
EUA (µg/min)	6,3 (2,8-17,4)	7,9 (3,5-14,7)	3,9 (0,1-17,5)	5,0* (2,1–434,9)
TFG (ml/min/1,73m ²)	133,6 ± 33,1	113,4 ± 12,9	139,8 ± 25,7	115,0 ± 22,1*
Hipertensão (sim)	0	2	0	7*
Pressão arterial média (mmHg)	82,1 ± 11,1	92,8 ± 12,0*	87,6 ± 9,0	91,9 ± 14,0
Retinopatia Diabética (sim)	2	3	3	10*
Neuropatia Autonômica (sim)	0	0	0	4

Dados expressos como média ± desvio padrão, mediana (variação) ou como número de pacientes com a característica estudada.

EUA: excreção urinária de albumina

TFG: taxa de filtração glomerular

*P<0,05: início vs final

III - Características dos pacientes agrupados de acordo com o polimorfismo

K121Q do gene PC-1

A distribuição dos genótipos do polimorfismo PC-1 foi: 22 pacientes KK, 7 pacientes KQ e 1 paciente QQ.

A frequência do alelo K foi de 0,85 e o alelo Q 0,15. A distribuição está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P=0,897$). A identificação dos genótipos está representada na Figura 6 através da PCR seguida de restrição enzimática com endonuclease de restrição *Ava II*. Na coluna 1 está o marcador de 100pb. A coluna 2 exemplifica um indivíduo KK, a coluna 3 um indivíduo heterozigoto KQ e coluna 4 um paciente homozigoto QQ.

De acordo com a presença do alelo Q, os pacientes foram classificados em grupo KK ou grupo KQ/QQ. As características iniciais dos pacientes DM tipo 1 divididos de acordo com o polimorfismo PC-1 estão descritas na Tabela 4. O grupo KQ/QQ teve uma maior proporção de indivíduos do sexo masculino quando comparado ao grupo KK (10/22 vs. 7/8; $P = 0,04$). Os grupos não diferiram em relação a idade, duração de diabetes e IMC. Os aspectos relevantes dos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes categorizados em grupo KK e grupo KQ/QQ no início e no final do estudo estão descritos na Tabela 5. Ao ingresso no estudo pacientes KK e KQ não apresentaram diferença na proporção de retinopatia diabética, nos valores de HbA_{1c}, na uréia urinária, TFG, EUA e pressão arterial. Não foram observadas modificações durante o estudo nos dois grupos em relação a uréia urinária, PAM e

níveis de HbA₁C. Também a média da HbA₁C durante o estudo foi similar ($P > 0,05$) nos pacientes KK ($9,0 \pm 1,1\%$) e KQ/QQ ($9,1 \pm 1,8\%$). A proporção de pacientes que se tornou hipertensa ou desenvolveu neuropatia autonômica não foi significante ao final do estudo em ambos os grupos. Os níveis de EUA aumentaram e os valores de FG diminuíram nos dois grupos. Ao final do estudo 6 novos casos de retinopatia diabética foram observados nos 22 pacientes KK e 5 novos casos nos 8 dos pacientes KQ/QQ. O aumento na proporção de pacientes com retinopatia diabética foi significativo somente no grupo KQ/QQ ($P = 0,045$).

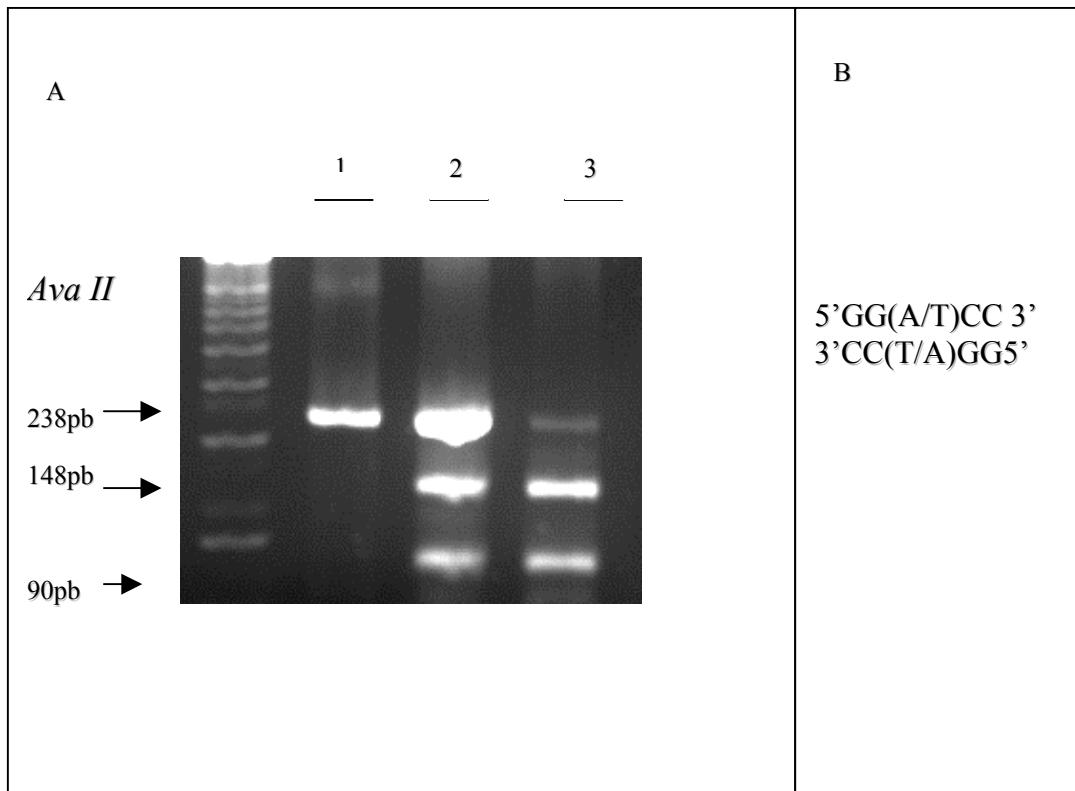


Figura 6. A - Gel de agarose a 3% ilustrativo da utilização diagnóstica da enzima de restrição *Ava II*. O indivíduo 1 é KK enquanto o indivíduo 2 é KQ e o indivíduo 3 é QQ. Nos indivíduos com o alelo Q o polimorfismo cria um sítio de restrição para esta enzima, levando a clivagem do fragmento de DNA. B – Sítio de restrição da enzima *Ava II*.

Tabela 4 - Características no início do estudo dos pacientes DM tipo 1 agrupados de acordo com os genótipos KK e KQ/QQ

	GENÓTIPO KK	GENÓTIPO KQ/QQ	P
N	22	8	-
Sexo (masculino)	10	7	0,04
Idade (anos)	31,9 ± 7,2	32,9 ± 6,3	0,332
Duração de DM	6,5 ± 3,8	7,4 ± 7,0	0,503
IMC (kg/m ²)	22,2 ± 2,7	22,0 ± 1,7	0,805

Dados expressos como média desvio padrão (variação) ou número de indivíduos com a característica estudada

DM: diabete melito

IMC: índice de massa corporal

Tabela 5 — Características no início e final do estudo dos pacientes DM tipo 1 agrupados de acordo com os genótipos KK ou KQ/QQ

	GENÓTIPO KK		GENÓTIPOS KQ /QQ	
	INÍCIO	FINAL	INÍCIO	FINAL
Glicohemoglobina (%)	9,7 ± 1,8	9,4 ± 1,4	9,3 ± 2,3	9,0 ± 2,1
Uréia urinária (g/24h)	19,4 ± 8,5	22,1 ± 6,1	21,7 ± 8,8	24,3 ± 4,8
Pressão arterial média (mmHg)	84,7 ± 11,0	90,5 ± 11,0	88,2 ± 6,6	97,1 ± 17,5
Hipertensão (sim)	0	5	0	4
Retinopatia Diabética (sim)	4	9	2	7*
Neuropatia Autonômica (sim)	0	3	0	1
Nefropatia Diabética (sim)	0	2	0	1
EUA (µg/min)	4,0 (0,1–17,5)	5,0* (2,5–434,9)	4,9 (2,4–9,0)	7,1* (2,1– 79,0)
TFG (ml/min/1.73m ²)	137,6 ± 28,0	115,3 ± 19,3*	137,3 ± 30,9	111,9 ± 19,4*

Dados expressos como média ± desvio padrão, mediana (variação) ou como número de pacientes com a característica estudada.

EUA: excreção urinária de albumina

TFG: taxa de filtração glomerular

*P < 0,05

DISCUSSÃO

A presença do alelo D do gene da ECA foi um fator de risco para a diminuição da TFG nesta coorte de pacientes DM tipo 1 acompanhada por 10 anos. Ainda, pacientes com os genótipos ID ou DD foram acometidos mais freqüentemente por hipertensão arterial e retinopatia diabética. Além disto, todos os novos casos de micro e macroalbuminúria ocorreram em pacientes com genótipos ID ou DD. Por outro lado não foi observado nenhuma associação entre a presença do alelo Q do gene do PC-1 e os parâmetros de função renal ou níveis de pressão arterial nesta coorte de pacientes DM tipo 1.

A associação entre o alelo D e o rápido declínio da TFG pode estar relacionada à observação de que pacientes com os genótipos ID ou DD tenham níveis séricos de ECA mais elevados do que pacientes com o genótipo II (76). Este aumento dos níveis de ECA pode estar associado com aumento dos níveis de angiotensina II no glomérulo, o que poderia favorecer a elevação da pressão intraglomerular e o acúmulo de matriz extracelular. O grau de controle metabólico teve influência significativa na mudança da TFG em uma coorte de pacientes por nós acompanhada por 8,4 anos (40). Porém neste estudo observamos que a influência do polimorfismo da ECA foi o maior determinante na modificação da TFG mesmo quando o controle glicêmico foi levado em consideração. Nossos resultados sugerem que o polimorfismo da ECA tem um importante papel na hemodinâmica intraglomerular renal com efeito no sistema renina-angiotensina. É como se a influência do polimorfismo da ECA na TFG começasse

precocemente no curso da doença renal diabética, e não somente após o estabelecimento da ND (85,94).

Contudo, nós e outros (90,91) não conseguimos identificar uma associação entre a presença do alelo D e os níveis da TFG iniciais. Em estudo transversal, Miller e colaboradores (90) estudaram o papel do polimorfismo da ECA na hemodinâmica renal de 39 pacientes com DM tipo 1 normoalbuminúricos. A TFG e o fluxo renal plasmático foram maiores nos pacientes com genótipo II do que nos pacientes com genótipo DD. Porém a fração de filtração (uma medida indireta da pressão tranlomerular) não foi diferente nos dois grupos. Em outro estudo transversal, Bouhanick e colaboradores (92) também não conseguiram evidenciar associação entre hiperfiltração glomerular e o genótipo DD em pacientes DM tipo 1 crianças e adolescentes. Como esperado, a única variável significativamente associada com TFG foi o grau do controle metabólico.

A presença do alelo D foi associada com hipertensão arterial em estudo transversal em pacientes com DM tipo 2 (127), mas não em pacientes DM tipo 1 (128). A predisposição à hipertensão em pacientes com a presença do alelo D pode estar relacionada à observação de que pacientes com o genótipo DD possuem níveis plasmáticos mais elevados de ECA do que pacientes com genótipo II (80). O aumento dos níveis plasmáticos de ECA poderia favorecer uma vasoconstrição sistêmica e reduzir o débito cardíaco pela geração de angiotensina II ou pela inativação de bradicinina.

Vários estudos transversais e caso-controle não encontraram uma associação entre polimorfismo da ECA e retinopatia diabética (129). O aumento significativo na proporção de novos casos de retinopatia diabética observado em nossos pacientes com os genótipos ID ou DD pode se dever a diferentes delineamentos de estudo ou mais provavelmente ao aumento nos níveis de pressão arterial que também foi observado nestes pacientes. Em análise de regressão múltipla realizada com a retinopatia diabética como variável dependente, somente a presença de hipertensão ao final do estudo permaneceu significativamente associada com o desenvolvimento de retinopatia diabética. Esses dados estão em concordância com um recente estudo de caso-controle (18) que observou que a presença do genótipo DD e a pressão sistólica foram os principais fatores de risco para o desenvolvimento de retinopatia diabética proliferativa.

A associação do alelo D e a ND não pode ser estabelecida neste estudo por que somente 3 pacientes desenvolveram micro e macroalbuminúria após 10 anos de acompanhamento. No entanto, estes 3 pacientes pertenciam ao grupo portador do alelo D (ID/DD). De fato, duas recentes metanálises (92,93) confirmam que a presença do alelo D está associada à ND.

Os níveis de EUA aumentaram durante o estudo, mesmo quando os pacientes que desenvolveram ND foram excluídos da análise. O polimorfismo da ECA não foi associado com a mudança observada na EUA. Os valores da EUA no início do estudo foram o único fator associado com o aumento da EUA. Outros autores já observaram que valores normais aumentados da EUA (>8 a 10μ g/ min) estão associados com um

futuro desenvolvimento de ND em pacientes DM tipo 1 (42) e DM tipo 2 (15). Em nosso estudo os níveis iniciais de EUA foram muito menores [4,05 (0,1 – 17,5) $\mu\text{g}/\text{min}$] do que os valores reportados em tais estudos. Se a associação positiva da EUA inicial com o aumento da mesma ao longo do tempo for mantida depois de um longo período de seguimento, pacientes com níveis de EUA iniciais normais aumentados terão presumivelmente risco maior de desenvolver ND. Portanto, pode ser especulado que a ausência de significativa associação entre o alelo D e o aumento da EUA, no presente estudo, não tenha sido ainda observada porque os pacientes que irão progredir para a ND estavam em estágios muito precoces de doença renal no momento da análise.

Nós não identificamos qualquer efeito do polimorfismo K121Q do gene do PC-1 nesta coorte de pacientes com DM tipo 1 normoalbuminúricos e normotensos, exceto um aumento no número de casos novos de retinopatia em pacientes portadores do alelo Q. Contudo a presença deste alelo não permaneceu significativamente associada com o desenvolvimento de retinopatia na análise multivariada. Outros autores descreveram recentemente que a presença do alelo Q em pacientes com DM tipo 1 macroalbuminúricos foi um significativo determinante do declínio da TFG (100). Provavelmente o polimorfismo K121Q seja um forte fator de risco para a progressão e não para o início da ND. Além disso, a ausência de um efeito do alelo Q em nosso estudo pode se dever a diferença genética das populações estudadas.

Uma limitação deste estudo é o relativo pequeno número de pacientes estudados e os poucos casos de ND. Para se detectar uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre

os indivíduos II e ID/DD em termos de desenvolvimento de ND, pelo menos mais 5 novos casos de micro ou macroalbuminúria deveriam ocorrer; para isto um maior período de seguimento seria necessário. Porém os dados apresentados sugerem que portadores do alelo D têm um risco aumentado para o desenvolvimento de ND e complicações relacionadas.

Em conclusão, a presença do genótipo DD ou ID do polimorfismo da ECA nesta coorte de pacientes DM tipo 1 está associada a um aumento de proporção de complicações microvasculares e hipertensão arterial. Porém, a genotipagem não deve ainda ser incluída na avaliação clínica destes pacientes até que nós tenhamos a confirmação do seu papel como fator de risco para o desenvolvimento de complicações microvasculares em uma amostra maior de pacientes com DM.

CONCLUSÃO

Em pacientes com DM tipo 1 normoalbuminúricos e normotensos a presença do alelo D (genótipos ID/DD) quando avaliado o polimorfismo do gene da ECA está associada a uma maior proporção de desenvolvimento de complicações microvasculares e hipertensão arterial quando comparado com pacientes com a ausência deste alelo.

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO (PACIENTE)

Título do Projeto: Polimorfismos de Inserção/Deleção do gene da ECA e K121Q do gene PC-1 em pacientes DM 1 normoalbuminúricos: estudo com 10 anos de acompanhamento

A nefropatia diabética é uma complicação tardia do Diabete Melito que ocorre em até 40% dos pacientes. Não existe até o momento um exame específico para saber qual paciente irá desenvolvê-la. É possível que indivíduos predispostos apresentem variações em alguns genes que permitam saber se existe um maior risco para a problemas renais, e também, por problemas oculares e relacionados ao coração, como a hipertensão arterial.

Este estudo visa estudar alguns dos genes que poderão estar envolvidos e relacioná-los com outros exames do laboratório para que no futuro seja possível uma adequada prevenção das complicações crônicas que acometem os rins, olhos e coração dos pacientes com diabete.

Estou ciente de que serei submetido à coleta de 10mL de sangue venoso periférico para a extração do DNA (código genético). O material genético (DNA) do meu sangue será examinado por pesquisadores do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e os resultados poderão ser compartilhados com pesquisadores de outros centros. Também fui informado que serei submetido a um exame de medida de filtração dos rins onde serão coletadas 4 amostras de 20mL de sangue na qual material radioativo é utilizado. A radiação a que serei exposto é equivalente à metade da radiação de uma chapa de Raio X de tórax. No caso de mulheres o exame não deve ser realizado se houver suspeita ou confirmação de gravidez. Eu entendo que os resultados ou informações compartilhados com outros pesquisadores não irão conter meu nome ou outra informação que possa me identificar.

Eu fui informado que toda a informação coletada sobre mim para este estudo será considerada confidencial e não será revelada a outros. Dados que possam me identificar, como nome, serão mantidos em um arquivo separado das demais

informações do estudo. Meu sangue e todas as demais informações sobre mim serão identificadas somente por números.

Apesar de todos os cuidados para manter as informações sobre mim confidencial existe o risco de que a informação perceptível (por exemplo o fato de eu ter nefropatia diabética, ou de ter risco de ter nefropatia diabética ou outra doença) possa ser descoberto ou inferido por meus familiares. Da mesma forma eu posso descobrir ou inferir sobre dados de meus familiares.

Eu fui informado que nenhum benefício direto é prometido para mim como um participante do estudo. Eu compreendo que os resultados da extração de meu DNA me serão fornecidos e que estes resultados podem não alterar o plano terapêutico de minha enfermidade. Eu também compreendo que posso sair do projeto ou negar-me a realizar qualquer procedimento a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer prejuízo a meu atendimento.

Eu fui informado e compreendo o objetivo do projeto descrito acima e seus procedimentos. Eu também fui informado e entendi dos riscos, desconfortos e benefícios previstos.

Eu fui informado e compreendi que tenho acesso ao comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre se tiver qualquer questão em relação aos meus direitos como participante do projeto de pesquisa, através de seu presidente ou representante legal. Eu também compreendo que o comitê pode ter acesso a mim e/ou meus dados para desempenho de suas atribuições.

O pesquisador responsável é a bioquímica Caroline Abrão Dalmáz sob orientação da Prof^a. Dr^a. Mirela Jobim do Azevedo.

Fone para contato no HCPA ++ - 51-316-81-27.

Pesquisador

Data e local

Paciente

Data e local

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSEN AR, CHRISTIANSEN JS, ANDERSEN JK *et al*: Diabetic nephropathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes. An epidemiologic study. *Diabetologia* 25:496-501, 1983.
2. UNITED STATES RENAL DATA SYSTEMS: USRDS 1999 Annual Data Report. National Institute of Health. National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, April, 1999.
3. NELSON RJ, PETTITT DJ, CARRAHER MJ, BAIRD HR, KNOWLER WC: Effect of proteinuria on mortality in NIDDM. *Diabetes* 37: 1499-1504, 1988.
4. BRUNO R, GROSS JL. Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis. A 3.6-year follow –up study. *J Chron Compl* 14: 266-271, 2000.
5. BROWN JB, PEDULA KL, BAKST AW: The progressive costs of complications in type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 159: 1873-1880, 1999.
6. MATHIESEN ER, HILSTED J, FELDT-RASMUSSEN B, *et al.*: The effect of metabolic control on hemodynamics in short-term insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes* 34: 1301-1305, 1985.
7. IBRAHIM HN, HOSTETTER TH: Diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 8: 487-493, 1997.
8. BRUNO G, CAVALLO-PERIN P, BARGERIO G, BORRA M, CALVI V, D'ERRICO N, DEAMBROGIO P, PAGANO G: Prevalence and risk factors

- for micro- and macroalbuminuria in an Italian population-based cohort of NIDDM subjects. *Diabetes Care* 19(1): 43-47, 1996.
9. GALL MA, HOUGAARD P, BORCH-JOHNSEN K, PARVING HH: Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: prospective, observational study. *Br Med J* 314: 783-788, 1997.
 10. THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-986, 1993.
 11. UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP (UKPDS 33): Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet* 352: 837-853, 1998.
 12. RAVID M, BROSH D, RAVID-SAFRAN D, LEVY Z, RACHMANI R: Main risk factors for nephropathy in type 2 diabetes mellitus are plasma cholesterol levels, mean blood pressure, and hyperglycemia. *Arch Intern Med* 158: 998-1004, 1998.
 13. UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP (UKPDS 38): Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: *Br Med J* 317: 703-712, 1998.

14. LAFFERTY AR, WETHER GA, CLARKE CF. Ambulatory blood pressure, microalbuminuria, and autonomic neuropathy in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 23: 533-538, 2000.
15. SILVEIRO SP, FRIEDMAN R, AZEVEDO MJ, CANANI LH, GROSS JL: Five-year prospective study of glomerular filtration rate and albumin excretion rate in normofiltering and hyperfiltering normoalbuminuric NIDDM patients. *Diabetes Care* 19: 171-174, 1996.
16. SILVEIRO SP, COSTA LA, BECK MO, GROSS JL: Urinary albumin excretion rate and glomerular filtration rate in single-kidney type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Care* 21: 1521-1524, 1998.
17. ORTH SR, RITZ E, SCHRIER RW: The renal risks of smoking. *Kidney Int* 51: 1669-1677, 1997.
18. RABENSTEINER D, ABRAHAMIAN H, IRSIGLER K, *et al.* ACE gene polymorphism and proliferative retinopathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 22:1530-1535, 1999.
19. PECIS M, AZEVEDO MJ, SOARES RS, FERLIN EL, GROSS JL: Autonomic dysfunction and urinary albumin excretion rate are associated with an abnormal blood pressure pattern in normotensive normoalbuminuric type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*, 23: 989-993, 2000.
20. RITZ E, STEFANSKI A: Diabetic nephropathy in type II diabetes. *Am J Kidney Dis* 27: 167-194, 1996.

21. TOELLER M, BUYKEN A, HEITKAMP G, et al. Protein intake and urinary albumin excretion rates in the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia* 40: 1219-1226, 1997.
22. KROLEWSKI AS. Genetics of diabetic nephropathy: Evidence for major and minor gene effects. *Kidney Int* 55: 1582-1596, 1999.
23. VIJAN S, HOFER TP, HAYWARD RA: Estimated benefits of glycemic control in microvascular complications in type 2 diabetes. *Ann Intern Med* 127: 788-795, 1997.
24. SHICHIRI M, KISHIKAWA H, OHKUBO Y, WAKE N. Long-term results of the Kumamoto study on optimal diabetes control in type diabetic patients. *Diabetes Care* 23 (Suppl. 2):B21-B29, 2000.
25. WALKER WG, HERMANN J, MURPHY R, PATZ A: Elevated blood pressure and angiotensin II are associated with accelerated loss of renal function in diabetic nephropathy. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 97: 94-104, 1985.
26. NELSON RG, PETTITT DJ, BAIRD HR, CHARLES MA, LIU QZ, BENNETT BH, KNOWLER WC: Pre-diabetic blood pressure predicts urinary albumin excretion after the onset of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in Pima Indians. *Diabetologia* 36: 998-1001, 1993.
27. PARVING H-H, SMIDT UM, HOMMEL E, et al.: Effective antihypertensive treatment postpones renal insufficiency in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 22: 188-195, 1993.

28. NIELSEN S, SCHMITZ A, REHLING M, MOGENSEN CE: Systolic blood pressure relates to the rate of decline of glomerular filtration rate in type II diabetes. *Diabetes Care* 16: 1427-1432, 1993.
29. PECIS M, AZEVEDO MJ, GROSS JL: Glomerular hyperfiltration is associated with blood pressure abnormalities in normotensive normoalbuminuric type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 20: 1329–1333, 1997.
30. MOGENSEN CE: Glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term and long-term juvenile diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 28: 91-100, 1971.
31. MOGENSEN CE, ANDERSEN MJF: Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes. *Diabetes* 22: 706-712, 1973.
32. DIETZEL J, JUNKER K: Abnormal glomerular filtration rate, renal plasma flow and renal protein excretion in recent and short-term diabetes. *Br Med J* 2: 13-19, 1972.
33. VORA JP, DOLBEN J, DEAN JD, THOMAS D, WILLIAMS JD, OWENS DR, PETERS JR: Renal hemodynamics in newly presenting non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 41: 829-835, 1992.
34. SILVEIRO SP, FRIEDMAN R, GROSS JL: Glomerular hyperfiltration in NIDDM patients without overt proteinuria. *Diabetes Care* 16: 115-119, 1993.
35. BRENNER BM, LAWLER EV, MACKENZIE HS: The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. *Kidney Int* 49: 1744-1777, 1996.

36. MOGENSEN CE: Early glomerular hyperfiltration in insulin-dependent diabetics and late nephropathy. *Scand J Clin Lab Invest* 46: 201-206, 1986.
37. MOGENSEN CE, CHRISTENSEN CK: Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent diabetic patients. *N Engl J Med* 311: 89-93, 1984.
38. RUDBERG S, PERSSON B, DAHLQUIST G: Increased glomerular filtration rate as a predictor of diabetic nephropathy - An 8-year prospective study. *Kidney Int* 41: 822-828, 1992.
39. YIP JW, JONES SL, WISEMAN MJ, HILL C, VIBERTI GC: Glomerular hyperfiltration in the prediction of nephropathy in IDDM. A 10-year follow-up study. *Diabetes* 45: 1729-1733, 1996.
40. CARAMORI MLA, GROSS JL, PECIS M, AZEVEDO MJ: Glomerular filtration rate, urinary albumin excretion rate and blood pressure changes in normoalbuminuric normotensive type 1 diabetic patients: an 8-year follow-up study. *Diabetes Care* 22: 1512-1516, 1999.
41. AZEVEDO MJ, GROSS JL: Follow-up of glomerular hyperfiltration in normoalbuminuric type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 4: 611, 1991.
42. MICROALBUMINURIA COLLABORATIVE STUDY GROUP, UNITED KINGDOM: Risk factors for development of microalbuminuria in insulin dependent diabetic patients: a cohort study. *Br Med J* 306: 1235-1239, 1993.
43. CARAMORI ML, FIORETTO P, MAUER M.: The need for early predictors of diabetic nephropathy risk. *Diabetes* 49:1399-1408, 2000.

44. NELSON RG, KNOWLER WC, PETTITT DJ, HANSON RL, BENNETT PH: Incidence and determinants of elevated urinary albumin excretion in Pima Indians with NIDDM. *Diabetes Care* 18: 182-187, 1995.
45. FUJISAWA T, IKEGAMI H, SHEN GQ, *et al.* Angiotensin I-converting Enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction, but not with retinopathy or nephropathy in NIDDM. *Diabetes Care* 18:983-985, 1995.
46. NAGI DK, MANFIELD MW, STICKLAND MH, *et al.* Angiotensin Converting Enzyme insertion/deletion polymorphism, and diabetic retinopathy in subjects with IDDM and NIDDM. *Diabetic Med* 12:997-1001, 1995.
47. TARNOW L, CAMBIEN F, ROSSING P, NIELSEN FS, HANSEN BV, LECERF L, POIRIER O, DANILOW S, PARVING HH: Lack of relationship between an insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene and diabetic nephropathy and proliferative retinopathy in IDDM patients. *Diabetes* 44: 489-494, 1995.
48. MARRE M, BERNADET P, GALLOIS Y, SAVAGNER F, GUYENNE TT, HALLAB M, CAMBIEN F, PASSA P, ALHENC-GELAS F: Relationship between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels, and diabetic retinal and renal complications. *Diabetes* 43: 384-388, 1994.
49. WINOCUR PH, DHAR H, ANDERSON DC: The relationship between autonomic neuropathy and urinary sodium and albumin excretion in insulin-treated diabetics. *Diabet Med* 3: 436-440, 1986.

50. KROLEWSKI, A.S., J.H. WARRAM, A.R. CHRISTLIEB, E.J. BUSICK, AND C.R. KAHN: The changing natural history of nephropathy in type I diabetes. *Am J Med*, 78(5): p. 785-94, 1985.
51. SEAQUIST ER, GOETZ FC, RICH S, BARBOSA J: Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 320: 1161-1165, 1989.
52. PETTITT DJ, SAAD MF, BENNETT PH, NELSON RG, KNOWLER WC: Familial predisposition to renal disease in two generation of Pima Indians with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 33: 438-443, 1990.
53. EARLE K, WALKER J, HILL C, VIBERTI GC: Familial clustering of cardiovascular disease in patients with insulin-dependent diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 326: 673-677, 1992.
54. KROLEWSKI AS, CANESSA M, WARRAM JH, LAFFEL LMB, CHRISTLIEB AR, KNOWLER WC, RAND LI: Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 318:140-145, 1988.
55. FARONATO PP, MAIOLI M, TONOLO G, *et al*: Clustering of albumin excretion rate abnormalities in Caucasian patients with NIDDM. *Diabetologia* 40: 816-823, 1997.
56. KHOURY MJ, BEATY TH, LIANG K-Y: Can familial aggregation of disease be explained by environmental risk factors? *Am J Epidemiol* 127: 674-683, 1988.

57. VIBERTI GC, KEEN H, WISEMAN MJ: Raised arterial pressure in parents of proteinuric insulin dependent diabetic patients. *Br Med J* 295: 515-517, 1987.
58. CANANI LH, GERSHMAN F, GROSS JL: Familial clustering of diabetic nephropathy in Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes* 48: 909-913, 1999.
59. TARNOW L, ROSSING P, NIELSEN F, *et al.* cardiovascular morbidity and early mortality cluster in parents of type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 23: 30-33, 2000.
60. KROLEWSKI AS, DANIEL NG, CANANI LH, WARRAM JH. Genetics of diabetic nephropathy: how far are we finding susceptibility genes? *Advances in Nephrology*: 31. Ed Mosby, 2001.
61. HEESOM AE, HIBBERD ML, MILLWARD A and DEMAINE AG: Polymorphism in the 5'-end of the aldose reductase gene is strongly associated with the development of diabetic nephropathy in type I diabetes. *Diabetes* 46(2): 287-91, 1997.
62. DYER PH, CHOWDHURY TA, DRONSFIELD MJ, DUNGER D, BARNETT AH and BAIN SC: The 5'-end polymorphism of the aldose reductase gene is not associated with diabetic nephropathy in Caucasian type I diabetic patients [letter]. *Diabetologia*, 42(8): 1030-1, 1999.
63. D.P.K. NG, CONN J, CHUNG SSM and LARKINS RG: Aldose reductase (AC)n microsatellite polymorphism and diabetic microvascular complications in Caucasian Type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* (In press).

64. ZANCHI A, MOCZULSKI DK, HANNA LS, WANTMAN M, WARRAM JH and KROLEWSK AS: Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Kidney Int* 57(2): 405-13, 2000.
65. CAI H, WANG X, COLAGIURI S and WILCKEN DE: A common Glu298-->Asp (894G-->T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and vascular complications in type 2 diabetes [letter]. *Diabetes Care*, 21(12): 2195-6, 1998.
66. DORIA A: Genetic markers of increased susceptibility to diabetic nephropathy. *Horm Res*, 50(Suppl 1): 6-11, 1998.
67. CHOWDHURY TA, DYER PH, KUMAR S, GIBSON SP, ROWE BR, DAVIES SJ, MARSHALL SM, MORRIS PJ, GILL GV, FEENEY S, MAXWELL P, SAVAGE D, BOULTON AJ, TODD JA, DUNGER D, BARNETT AH and BAIN SC: Association of apolipoprotein epsilon2 allele with diabetic nephropathy in Caucasian subjects with IDDM. *Diabetes*, 47(2): 278-80, 1998.
68. HADJADJ S, GALLOIS Y, SIMARD G, BOUHANICK B, PASSA P, GRIMALDI A, DROUIN P, TICHET J and MARRE M: Lack of relationship in long-term type 1 diabetic patients between diabetic nephropathy and polymorphisms in apolipoprotein varepsilon, lipoprotein lipase and cholesteryl ester transfer protein. *Nephrol Dial Transplant*, 15(12): 1971-1976, 2000.
69. TARNOW L, STEHOUWER CD, EMEIS JJ, POIRIER O, CAMBIEN F, HANSEN BV, PARVING HH: Plasminogen activator inhibitor-1 and

- apolipoprotein E gene polymorphisms and diabetic angiopathy. *Nephrol Dial Transplant*, 15(5): 625-30, 2000.
70. ETO M, HORITA K, MORIKAWA A, NAKATA H, OKADA M, SAITO M, NOMURA M, ABIKO A, IWASHIMA Y, IKODA A, and *et al.*: Increased frequency of apolipoprotein epsilon 2 allele in non-insulin dependent diabetic (NIDDM) patients with nephropathy. *Clin Genet*, 48(6): 288-92, 1995.
71. KIMURA H, SUZUKI Y, GEJYO F, KARASAWA R, MIYAZAKI R, SUZUKI S, and ARAKAWA M: Apolipoprotein E4 reduces risk of diabetic nephropathy in patients with NIDDM. *Am J Kidney Dis*, 31(4): 666-73, 1998.
72. UKKOLA O, KERVINEN K, SALMELA PI, VON DICKHOFF K, LAAKSO M, and KESANIEMI YA. Apolipoprotein E phenotype is related to macro- and microangiopathy in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 101(1): 9-15, 1993.
73. BOIZEL R, BENHAMOU PY, CORTICELLI P, VALENTI K, BOSSON JL, HALIMI S, and BOIZE R: ApoE polymorphism and albuminuria in diabetes mellitus: a role for LDL in the development of nephropathy in NIDDM? *Nephrol Dial Transplant*, 13(1): 72-5, 1998.
74. VAUHKONEN I, NISKANEN L, RYYNANEN M, VOUTILAINEN R, PARTANEN J, TOYRY J, MERCURI M, RAURAMAA R, and UUSITUPA M: Divergent association of apolipoprotein E polymorphism with vascular disease in patients with NIDDM and control subjects. *Diabet Med*, 14 (9): 748-56, 1997.

75. HANSON RL, EHM MG, PETTITT DJ, PROCHAZKA M, THOMPSON DB, TIMBERLAKE D, FOROUD T, KOBES S, BAIER L, BURNS DK, ALMASY L, BLANGERO J, GARVEY WT, BENNETT PH, and KNOWLER WC: An autosomal genomic scan for loci linked to type II diabetes mellitus and body-mass index in Pima Indians. *Am J Hum Genet* 63(4): 1130-8, 1998.
76. RIGAT B, HUBERT C, ALHENC-GELAS F, CAMBIEN F, CORVOL P, SOUBRIER F: An insertion deletion polymorphism in angiotensin I conversion enzyme gene accounting for half of the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86: 1343-1346, 1990.
77. MARRE M, JEUNMAITRE X, GALLOIS Y, RODIER M, CHATELLIER G, SERT C, DUSSELIER L, KAHAL Z, CHAILLOUS L, HALIMI S, MULLER A, SACKMANN H, BAUDUCEAU B, BLED F, PASSA P, ALHENC-GELAS F: Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 99: 1585-1595, 1997.
78. SCHMIDT S, SCHÖNE N, RITZ E: Diabetic nephropathy study group: association of ACE gene polymorphism and diabetic nephropathy. *Kidney Int* 47: 1176-1181, 1995.
79. CHOWDHURY TA, DRONSFIELD MJ, KUMAR S, GOUGH SLC, GIBSON SP, KHATOON A, MACDONALD F, ROWE BR, DUNGER DB, DEAN JD, DAVIES SJ, WEBBER J, SMITH PR, MACKIN P, MARSHALL SM, ADU D, MORRIS PJM, TODD JA, BARNETT AH, BOULTON AJM, BAIN SC:

- Examination of two genetic polymorphisms within the renin-angiotensin system: no evidence for an association with nephropathy in IDDM. *Diabetologia*: 39:1108-14, 1996.
80. HIBBERD ML, MILLWARD BA, DEMAINE AG: The angiotensin I-converting enzyme (ACE) locus is strongly associated with age and duration of diabetes in patients with type I diabetes. *J Diabetes Complications* 11:2-8, 1997.
81. BARNAS U, SCHMIDT A, ILLIEVICH A, KIENER H P, RABENSTEINER D, KAIDER A, PRAGER R, ABRAHAMIAN H, IRSIGLER K, MAYER G: Evaluation of risk factors for the development of nephropathy in patients with IDDM: insertion/deletion angiotensin converting enzyme gene polymorphism, hypertension and metabolic control. *Diabetologia* 40:327-221, 1997.
82. RINGEL J, BEIJE J, KUNZ R, DISTLER A, SHARMA AM: Genetic variants of the renin-angiotensin system, diabetic nephropathy and hypertension. *Diabetologia* 40:193-9, 1997.
83. DE COSMO S, MARGAGLIONE M, TASSI V, GARRUBBA M, THOMAS S, OLIVETTI C, PIRAS GP, TREVISAN R, VEDOVATO M, CAVALLO PERIN P, BACCI S, COLAIZZO D, CISTERNINO C, ZUCARO L, DI MINNO G, TRISCHITTA V, VIBERTI GC: ACE, PAI-1, decorin and Werner helicase genes are not associated with the development of renal disease in European patients with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 15:247-53, 1999.

84. VAN ITTERSUM FJ, DE MAN AM, THIJSSSEN S, DE KNIJFF P, SLAGBOOM E, SMULDERS Y, TARNOW L, DONKER AJ, BILO HJ, STEHOUWER CD: Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and complications of insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 15:1000-7, 2000.
85. PARVING H-H, JACOBSEN P, TARNOW L, ROSSING P, LACERF L, POIRIER O, *et al.*: Effect of deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene on progression of diabetic nephropathy during inhibition of angiotensin converting enzyme: observational follow up study. *Br Med J* 313: 591-594, 1996.
86. BJORCK S, BLOHME G, SYLVEN C, MULEC H: Deletion insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 12 Suppl 2:67-70, 1997.
87. POWRIE JK, WATTS GF, INGHAM JN *et al.*: Role of glycemc control in development of microalbuminuria in patients with insulin dependent diabetes. *Br Med J* 309:1608-1612, 1994.
88. PENNO G, CHATURVERDI N, PHILIPPA JT, *et al.*: Effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism on Progression of Renal Disease and the Influence of ACE Inhibition in IDDM Patients. *Diabetes* 47: 1507-1511, 1998.
89. HADJADJ S, BELLOUM R, BOUHANICK B, GALLOIS Y, GUILLOTEAU G, CHATELLIER G, ALHENC-GELAS F, MARRE M: 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, 2001.
90. MILLER JA, SCHOLEY JW, THAI K, *et al.*: Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and renal hemodynamic function in early diabetes. *Kidney Int* 51:, 119-124, 1997.
91. BOUHANICK B, GALLOIS Y, HADJADJ S, BOUX DE CASSON F, LIMAL JM, MARRE M: Relationship between glomerular hyperfiltration and ACE insertion/deletion polymorphism in type 1 diabetic children and adolescents. *Diabetes Care*, 22: 618-622, 1999.
92. STAESSEN JA, WANG JG, GINOCCHIO G, PETROV V, SAAVEDRA AP, SOUBRIER F, VLIETINCK R, FAGARD R. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens* 15(12 Pt 2): 1579-1592, 1997.
93. FUJISAWA T, IKEGAMI H, KAWAGUCHI Y, HAMADA Y, UEDA H, SHINTANI M, FUKUDA M, OGIHARA T. Meta-analysis of association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme gene with diabetic nephropathy and retinopathy. *Diabetologia* 41: 47-53, 1998.
94. RUDBERG S, RASMUSSEN LM, BANGSTAD H-J, OSTERBY R: Influence of insertion/deletion polymorphism in the ace-i gene on the progression of diabetic glomerulopathy in type 1 diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetes Care* 23: 544-548, 2000.

95. PIZZUTI A, FRITTITTA L, ARGIOLOS A, BARATTA R, GOLDFINE ID, BOZZALIM, ERCOLINO T, SCARLATO G IACOVIELLO L, VIGNERI R, TASSI V, TRISCHITTA V: A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance. *Diabetes* 48:1881-1884, 1999.
96. SHAO J, CATALANO PM, YAMASHITA H, *et al.*: Decreased insulin receptor tyrosina kinase activity and plasma cell membrane glycoprotein-1 overexpression in skeletal muscle from obese women with gestacional diabetes mellitus. *Diabetes* 49:603-610, 2000.
97. GOLDFINE ID, MADDUX B, YOUNGREN JF, *et al.*: Role of PC-1 in the etiology of insulin resistance. *Annals New York Academy of Sciences* 18: 204-222, 1999.
98. MADDUX BA, GOLDFINE ID: Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor α -subunit. *Diabetes* 49:13-18, 2000.
99. YIP J, MATTOCK MB, MOCORUTTI A, SETHI M, TREVISAN R, VIBERTI GC: Insulin resistance in insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Lancet* 342: 883-887, 1993.
100. DE COSMO S, ARGIOLOS A, MISCIO G, THOMAS S, PIRAS G, TREVISAN R, PERIN PC, BACCI S, ZUCARO L, MARGAGLIONE M, FRITTITTA L, PIZZUTI A, TASSI V, VIBERTI GC, TRISCHITTA V: A PC-1 amino acid variant (K121Q) is associated with faster progression of

- renal disease in patients with type 1 diabetes and albuminuria. *Diabetes* 49:521-5214, 2000.
101. TARNOW L, GRARUP N, HANSEN T, *et al.*: Diabetic microvascular complications are not associated with two polymorphisms in the GLUT-1 and PC-1 genes regulating glucose metabolism in Caucasian type 1 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant* 16:1653-1656, 2001.
 102. RASMUSSEN SK, URHAMMER AS, PIZZUTI A, *et al.*: The K121Q variant of the human PC-1 gene is not associated with insulin resistance or type 2 diabetes among Danish Caucasians. *Diabetes* 49: 1608-1611, 2000.
 103. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: Medical management of insulin-dependent (type 1) diabetes. Alexandria, VA, EUA, 1994.
 104. HAWTHORNE VM: Preventing the kidney disease of diabetes mellitus: public health perspectives. Consensus statement. *Am J Kidney Dis* 1: 2-6, 1989.
 105. GIFFORD RW Jr.: The Fifth Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High blood Pressure: insights and highlights from the chairman. *Cleve Clin J Med* 60: 273-277, 1993.
 106. THE WORKING GROUP ON HYPERTENSION IN DIABETES: Statement on Hypertension in Diabetes Mellitus. Final Report. *Hypertension* 23: 145-158, 1994.
 107. BLACK D, JAMES WPT, BESSER GM, *et al.*: Obesity: A report of the Royal College of Physicians. *J R Coll Physicians Lond* 17: 5, 1983.

108. WING DJ, MARTYN CN, YOUNG RJ, CLARKE MB: The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. *Diabetes Care*: 8, 491-498, 1985.
109. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: Nutrition Recommendations and Principles for People with Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20 (suppl 1): S14-S17, 1997.
110. AZEVEDO MJ. Hiperfiltração glomerular em pacientes diabéticos tipo 1 e efeito da dieta hipoprotéica a curto prazo sobre a filtração glomerular e a excreção urinária de albumina. Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação de Medicina: Clínica Médica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dezembro, 1988.
111. GILBERT R, PHILLIPS P, CLARKE C, JERUMS G: Day-night blood pressure variation in normotensive, normoalbuminuric type 1 diabetic subjects. *Diabetes Care* 17:824 - 827, 1995.
112. ZELMANOVITZ T, OLIVEIRA JR, LHULLIER F, GROSS JL, AZEVEDO MJ: Avaliação do método imunoturbidimétrico para a medida de excreção urinária de albumina em pacientes com diabetes melito. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 38:207-211, 1994.
113. UEDA S, HEELEY RP, ELLITT HL, CONNELL JMC: Mystyping of the human angiotensin-converting enzyme gene polymorphism: frequency, causes and possible methods to avoid errors in typing. *Journal of Molecular Endocrinology* 17: 27-30, 1996.

114. CHANTLER C, BARRAT TM: Estimation of glomerular filtration rate from plasma clearance of 51-chromium edetic acid. *Arch Dis Child* 47:613-617, 1972.
115. FRIEDMAN, AZEVEDO MJ, GROSS JL: Is Endogenous creatinine clearance still a reliable index of glomerular filtration rate in diabetic patients? *Brazilian J Med Biol Res* 21: 941-944, 1988.
116. TRIVELLI LA, RANNEY HM, LAI HT: Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 284: 353-357, 1971.
117. COEHN DL, ALLAWI J, BROPHY K, KEEN H, VIBERTI GC: Tolerance, safety and effects of Stabul, in aldose reductase inhibitor in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients with microalbuminuria (Abstract). *Diabetologia* 31:477A, 1989.
118. CAMARGO JL, ZELMANOVITZ T, PAGGI A, FRIEDMAN R, GROSS JL: Accuracy of conversion formulae for estimation of glycohemoglobin. *Scand J Clin Lab Invest* 58: 521-528, 1998.
119. TRINDER P: Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a noncarcinogenic chromogen. *J Clin Path*, 22:158-161, 1969.
120. ALLAIN CC, POON LS, CHAN CS, RICHMOND W, FU FC: Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20:470-475, 1974.
121. WARNICK GR, WOOD PD: National Cholesterol Education Program Recommendations for Measurements of High Density Lipoprotein Cholesterol. Executive Summary. *Clin Chem* 41:1427-1433, 1995.

122. MCGOWAN MW, ARTISS JD, STRANDBERGH DR, ZAK B: A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. Clin Chem 29: 538-542, 1983.
123. FABINY DL, ERTINGSHAUSEN G: Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the Centrif Chem. Clin Chem 17: 696, 1971.
124. SCHAFFER R, VELAPOLDI RA, PAULE RC, *et al.*: A multilaboratory – evaluated reference method for the determination of serum sodium. Clin Chem 27: 1824- 1828, 1981.
125. JOHANSSON RN, MEFTCALF PA, BAKER JR: Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycoprotein. An index of diabetic control: Clin Chem Acta 127: 87-95, 1982.
126. TALK H, SHUBERT GE: Enzymatische harnstoffbestimmung in blut und serum in optischen test nach warburg. Klin Wschr 43: 174-175, 1965.
127. PUJIA A, GNASSO A, IRACE C, DOMINIJANNI A, ZINGONE A, PERROTTI N, COLONNA A, MATTIOLI PL: Association between ACE-D/D polymorphism and hypertension in type II diabetic subjects. J Hum Hypertens 8: 687-91, 1994.
128. WIERZBICKI AS, NIMMO L, FEHER MD, COX A, FOXTON J, LANT AF: Association of angiotensin converting enzyme DD genotype with hypertension in diabetes. J Hum Hypertens 9: 671 - 3, 1995.

129. KENNONN B, PETRIE JR, SAMALL M, CONNELL MC: Angiotensin-converting enzyme gene and diabetes mellitus. *Diabet Med* 16: 448 - 458, 1999.