



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Roberta Arnoldi Cobas

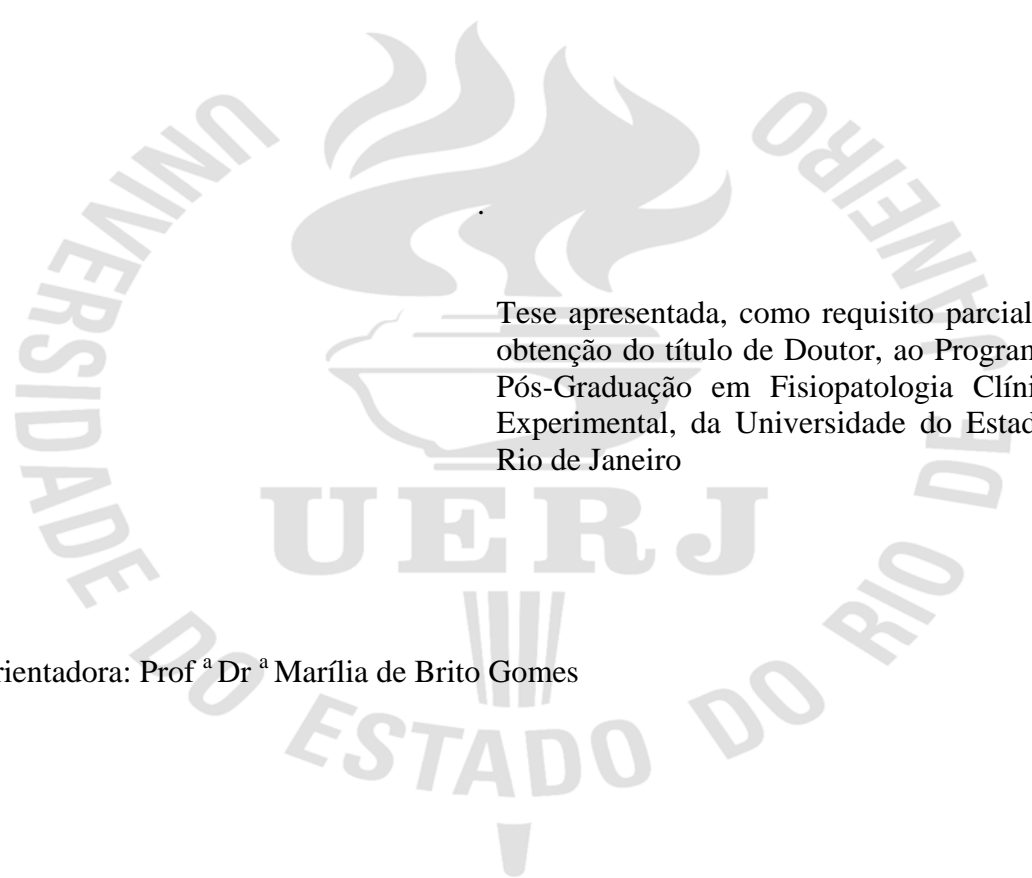
**Polimorfismos I/D do gene da enzima conversora de angiotensina e C242T
do gene do componente p22phox da NADPH oxidase em pacientes com
diabetes tipo 1**

Rio de Janeiro

2009

Roberta Arnoldi Cobas

Polimorfismos I/D do gene da enzima conversora de angiotensina e C242T do gene do componente p22phox da NADPH oxidase em pacientes com diabetes tipo 1



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Orientadora: Prof^a Dr^a Marília de Brito Gomes

Rio de Janeiro

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CB/A

C652 Cobas, Roberta Arnoldi.

Polimorfismo I/D do gene da enzima conversora de angiotensina e C242T do gene do componente p22phox da NADPH oxidase em pacientes com diabetes tipo 1 / Roberta Arnoldi Cobas. – 2009.

76 f. : il.

Orientadora: Marília de Brito Gomes.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Diabetes – Complicações e sequelas – Teses. 2. Diabetes mellitus tipo – Teses. 3. Complicações do diabetes – Teses. 4. Enzima conversora da angiotensina – Teses. Estresse oxidativo – Teses. Polimorfismo (Genética) – Teses. I. Gomes, Marília de Brito. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.379-008.64-06

Autorizo apenas para fins acadêmicos ou científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Roberta Arnoldi Cobas

Polimorfismos I/D do gene da enzima conversora de angiotensina e C242T do gene do componente p22phox da NADPH oxidase em pacientes com diabetes tipo 1

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Doutor.

Aprovado em 07 de outubro de 2009.

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Marília de Brito Gomes (Orientadora)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Prof. Dr. Edison Régio Souza
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Prof. Dr. Luis Cristóvão Porto
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Prof. Dr. Luis Henrique Canani
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRG

Prof. Dr. Adolpho Milech
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Rio de Janeiro

2009

DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Marília de Brito Gomes, pela confiança e incentivo.

À equipe do serviço de Diabetes do Hospital Pedro Ernesto, pela ajuda e disposição de sempre, pelo convívio agradável e pela amizade.

Ao Dr Ricardo Neves e todos do serviço de oftalmologia do HUPE, pela colaboração no estudo.

À equipe do laboratório de HLA da UERJ, pela paciência e dedicação.

À equipe do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/ UFRGS, especialmente à Dayse Crispim, por seus ensinamentos e disponibilidade.

Aos professores da pós-graduação FISCLINEX.

À secretária da pós-graduação, Amélia, pela ajuda e paciência.

À minha família, pelo amor de sempre.

A Deus.

O maior perigo que se corre em uma viagem é ela não começar.

Amyr Klink

Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação do nosso

próprio amanhã ”

Chico Xavier

RESUMO

COBAS, Roberta Arnoldi. *Polimorfismos I/D do gene da enzima conversora de angiotensina e C242T do gene do componente p22phox da NADPH oxidase em pacientes com diabetes tipo 1*. 2009. 76f Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

O sistema renina-angiotensina e o estresse oxidativo têm participação importante na fisiopatologia das complicações crônicas do diabetes. No presente estudo, foram avaliados 103 pacientes com diabetes tipo 1 (DM1) com idade de $28,8 \pm 10,6$ anos e duração de doença de $13,1 \pm 8,5$ anos e 158 controles não diabéticos quanto à presença dos polimorfismos I/D da ECA e C242T do p22phox, componente essencial para a ativação da NADPH oxidase. Esta análise foi realizada por reação de polimerase em cadeia para ambos os polimorfismos, seguida de restrição enzimática para avaliação do polimorfismo C242T p22phox. Ambas as distribuições genóticas obedeciam ao princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os pacientes diabéticos foram submetidos a avaliação clínica e laboratorial quanto à presença de fatores associados ao risco de complicações (história de tabagismo e antecedentes familiares de diabetes tipo 2, dose diária de insulina, níveis pressóricos, índice de massa corporal, relação cintura-quadril, excreção urinária de albumina, taxa de filtração glomerular, perfil lipídico, controle glicêmico, níveis de proteína C-reativa) e rastreados quanto à presença de nefropatia diabética, considerada presença de micro ou macroalbuminúria; retinopatia diabética não proliferativa ou proliferativa e hipertensão arterial. Não houve diferença significativa entre a presença dos alelos D e I da ECA ou C e T do p22phox entre diabéticos e controles. Os polimorfismos avaliados não apresentaram associação com a presença de nefropatia, retinopatia ou hipertensão arterial. Pacientes portadores do alelo D apresentaram maiores níveis de pressão arterial diastólica ($72,2 \pm 12,3$ vs $65,4 \pm 11,6$ mmHg, $p=0,047$) e proteína C-reativa comparados aos portadores do genótipo II [$0,18$ (0,04-0,38) vs $0,09$ (0,04-0,16) mg/dl, $p=0,05$], porém ambas as análises perderam significância estatística após correção para duração do diabetes. A combinação dos polimorfismos não esteve associada à presença de complicações microvasculares ou hipertensão arterial. Concluímos que, na população de diabéticos tipo 1 estudada, a frequência dos polimorfismos I/D da ECA e C242T do p22phox, isoladamente ou em combinação, não apresentou diferença em pacientes com ou sem complicações microvasculares precoces ou hipertensão arterial. Os níveis dos diferentes marcadores de risco cardiovascular também não apresentaram diferença nos pacientes com os polimorfismos acima descritos. Entretanto, estudos prospectivos poderão determinar a possível interação entre estes polimorfismos e a duração do diabetes na expressão clínica das complicações crônicas da doença.

Palavras-chave: Complicações crônicas, diabetes tipo 1, enzima conversora da angiotensina, estresse oxidativo, NADPH oxidase, polimorfismo genético.

ABSTRACT

The renin-angiotensin system and the oxidative stress play an important role in the pathogenesis of the diabetic complications. In the present study 103 patients with type 1 diabetes (T1DM) aged 28.8 ± 10.6 years and with a disease duration of 13.1 ± 8.5 years and 158 non-diabetic controls were evaluated for the presence of the I / D polymorphism of the angiotensin converting enzyme (ACE) and the C242T polymorphism of the p22phox, an essential component for NADPH oxidase activation. The analysis was performed using polymerase chain reaction for both polymorphisms, followed by enzymatic restriction for C242T p22phox polymorphism. Genotypic distributions of both polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. Diabetic patients underwent clinical and laboratory evaluation for the presence of risk factors associated with complications of diabetes (smoking and family history of type 2 diabetes, daily insulin dose, blood pressure, body mass index, waist – hip ratio, urinary albumin excretion, glomerular filtration rate, lipid profile, glycemic control, C-reactive protein levels) and screened for the presence of diabetic nephropathy, considered as the presence of micro or macroalbuminuria, diabetic retinopathy and hypertension. There was no significant difference between the presence of ACE D or I allele and p22phox C or T allele between diabetic patients and controls. The evaluated polymorphisms were not associated with the presence of nephropathy, retinopathy or hypertension. Patients with the D allele showed higher levels of diastolic blood pressure (72.2 ± 12.3 vs 65.4 ± 11.6 mmHg, $p = 0.047$) and C-reactive protein compared with those carrying the II genotype [0.18 (0.04-0.38) vs 0.09 (0.04-0.16) mg/dl, $p = 0.05$], but both analysis lost statistical significance after correction for duration of diabetes. The combination of both polymorphisms was not associated with microvascular complications or hypertension. We conclude that in the studied population of type 1 diabetic patients, the frequency of ACE I / D and C242T of p22phox polymorphisms, alone or in combination, was not different in patients with or without early microvascular complications or hypertension. Also, the levels of different markers of cardiovascular risk did not differ for patients with the polymorphisms described above. However, prospective studies may determine the possible interaction between these polymorphisms and duration of diabetes in the clinical expression of chronic complications of diabetes.

Keywords: Angiotensin converting enzyme, chronic complications, genetic polymorphism, NADPH oxidase, oxidative stress, type 1 diabetes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados clínicos e demográficos dos pacientes diabéticos tipo 1 excluídos e incluídos no estudo.....	35
Tabela 2	Dados clínicos dos pacientes diabéticos tipo 1 incluídos no estudo.....	36
Tabela 3	Dados laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo 1 incluídos no estudo.....	36
Tabela 4	Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo I/D da ECA no grupo controle e nos pacientes diabéticos tipo 1.....	37
Tabela 5	Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo C242T do p22phox no grupo controle e nos pacientes diabéticos tipo 1.....	37
Tabela 6	Comparação entre os portadores e não portadores de nefropatia quanto à distribuição genotípica da ECA e do p22phox.....	39
Tabela 7	Comparação entre os portadores e não portadores de retinopatia quanto à distribuição genotípica da ECA e do p22phox.....	40
Tabela 8	Comparação entre os portadores e não portadores de hipertensão arterial quanto à distribuição genotípica da ECA e do p22phox.....	40
Tabela 9	Comparação entre a distribuição das combinações dos polimorfismos entre portadores ou não de nefropatia, retinopatia e hipertensão arterial.....	41
Tabela 10	Comparação dos dados clínico-demográficos entre as diferentes distribuições genotípicas da ECA e do p22phox	42
Tabela 11	Comparação dos dados laboratoriais entre as diferentes distribuições genotípicas da ECA e do p22phox	43

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Exemplo de distribuição dos genótipos do polimorfismo I/D da ECA em fotografia de gel de eletroforese.....	30
Figura 2	Exemplo de distribuição dos genótipos do polimorfismo C242T do p22phox em fotografia de gel de eletroforese.....	33
Gráfico 1	Distribuição genotípica da ECA e do p22phox entre diabéticos tipo 1 e controles.....	38
	..	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC	Acidente vascular cerebral
BRA	Bloqueadores do receptor de angiotensina-2
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doença cardiovascular
DM1	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2
ECA	Enzima conversora da angiotensina-1
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
iECA	Inibidores da enzima conversora da angiotensina-1
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NOS	Óxido nítrico sintase
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PKC	Proteína quinase C
SRAA	Sistema Renina-angiotensina-aldosterona
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1 REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1 Fisiopatologia das complicações crônicas do diabetes	14
1.1.1 <u>Papel do sistema NADPH oxidase e do estresse oxidativo</u>	14
1.1.2 <u>Papel do sistema renina- angiotensina-aldosterona</u>	17
1.2 Polimorfismos Genéticos	18
1.2.1 <u>O polimorfismo C242T do componente p22phox da NADPHoxidase</u>	19
1.2.2 <u>Estudos com polimorfismo C242T do p22phox</u>	19
1.2.3 <u>O polimorfismo I/D da Enzima conversora de angiotensina</u>	20
1.2.4 <u>Estudos com polimorfismo I/D da ECA</u>	20
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Desenho do estudo	24
3.2 População	24
3.2.1 <u>Pacientes</u>	24
3.2.2 <u>Controles</u>	24
3.3 Avaliação clínica dos pacientes diabéticos	24
3.4 Avaliação laboratorial dos pacientes diabéticos	25
3.5 Coleta e extração do DNA	27
3.6 Preparo da cuba de eletroforese e do gel de agarose	27
3.7 Aplicação das amostras no gel e corrida de eletroforese	27
3.8 Análise do polimorfismo I/D da ECA	28
3.8.1 <u>Amplificação da região genômica contendo o polimorfismo I/D</u>	28
3.8.2 <u>Eletroforese em gel de agarose</u>	29
3.8.3 <u>Visualização da bandas</u>	30
3.9 Análise do polimorfismo C242T do p22phox	31
3.9.1 <u>Amplificação da região genômica contendo o polimorfismo C242T</u>	31
3.9.2 <u>Digestão dos produtos de amplificação pela enzima <i>RSAI</i></u>	32
3.9.3 <u>Eletroforese em gel de agarose</u>	32
3.9.4 <u>Visualização da bandas</u>	33
3.10 Avaliação da frequência alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg	34

3.11	Análise estatística	34
4	RESULTADOS	35
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
	ANEXO A - Manuscrito em preparação para publicação.....	60
	ANEXO B - Termo de Consentimento livre e esclarecido.....	76

INTRODUÇÃO

O Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença crônica, atualmente considerada a endocrinopatia mais comum da infância e adolescência. (1)

Pacientes portadores de DM 1 apresentam um substancial risco de complicações crônicas micro e macrovasculares (2), resultando em baixas qualidade e expectativa de vida para o paciente e elevado custo para o sistema de saúde. Do total de despesas relacionadas ao diabetes, cerca de 50% são devidas às complicações da doença. (3)

Os fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de complicações crônicas do diabetes incluem o controle glicêmico, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) e a dislipidemia. (4) Sabe-se que elevações prolongadas da glicemia podem levar à glicação de proteínas no sangue e na parede arterial, determinando aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio e disfunção endotelial.

A presença de HAS apresenta forte correlação com a incidência de complicações e há evidências de que os efeitos deletérios da HAS ocorrem mesmo com pressão arterial mínima a moderadamente elevada. (5)

O estresse oxidativo e a disfunção endotelial são considerados eventos precoces no desenvolvimento de complicações tanto micro quanto macrovasculares e poderiam ser considerados o denominador comum através do qual hiperglicemia, HAS e dislipidemia atuam.

Entretanto, paralelamente a estes fatores de risco, existe uma suscetibilidade individual ao desenvolvimento de complicações e fatores genéticos têm sido estudados como possíveis contribuintes.(6)

Considerando que pacientes portadores de DM1 apresentam elevada morbimortalidade em idade precoce devido às complicações crônicas da doença, o rastreamento destas complicações e a identificação de subgrupos de pacientes sob maior risco de desenvolvê-las assume relevante importância.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Fisiopatologia das complicações crônicas do diabetes

A fisiopatologia de doenças complexas, como nefropatia e retinopatia diabéticas e hipertensão arterial, envolve uma suscetibilidade genética associada à influência de fatores ambientais.

Monti *et al* investigaram história familiar como fator de risco em 4935 pacientes diabéticos tipo 1 de diferentes etnias (maioria caucasianos) com ou sem complicações crônicas microvasculares. A presença de retinopatia, nefropatia ou neuropatia em pelo menos um parente aumentou o risco da presença desta complicação nos pacientes, principalmente no sexo feminino. A presença de história familiar de diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) em um dos pais também esteve associada a maior risco de nefropatia. (6) Este estudo sugere uma suscetibilidade genética ao desenvolvimento de complicações possivelmente independente da suscetibilidade ao diabetes tipo 1.

Paralelamente à suscetibilidade genética, fatores metabólicos e hemodinâmicos possuem importante papel na patogênese das complicações crônicas do diabetes. O acometimento vascular, que ocorre em pequenos e grandes vasos, é a base fisiopatológica fundamental no desenvolvimento de tais complicações. O estresse oxidativo, mediado em parte pela atividade da enzima NADPH oxidase, e o sistema renina-angiotensina (SRA) podem ser considerados importantes contribuintes para o dano vascular induzido pelo diabetes.

1.1.1 Papel do sistema NADPH oxidase e do estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas quimicamente instáveis e altamente reativas por apresentarem um ou mais elétrons não emparelhados. (7) São produzidas constantemente nos organismos aeróbios e funcionam como mensageiros secundários na regulação da expressão de gens sensíveis ao sinal redox (ex. gen do NFkB) e

na síntese de moléculas fisiologicamente ativas (ex. mediadores inflamatórios). São geradas a partir de enzimas que utilizam o oxigênio como aceptor de elétrons. Entre elas estão nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, óxido nítrico sintase (NOS) na sua forma desacoplada, xantina oxidase, cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, lipoxigenase, cicloxigenase e citocromo P450. As três primeiras constituem as principais fontes geradoras de EROs na parede vascular. (8,9)

A forma ativada da NADPH oxidase é responsável pela redução do elétron do oxigênio molecular para formar ânion superóxido $[NAD(P)H + 2 O_2 \rightarrow NAD(P)^+ + H^+ + 2 O_2^-]$. (7) A produção de superóxido (O_2^-) é máxima em condições de alta tensão de oxigênio e concentração de NAD(P)H. (10) Postula-se que esta enzima funcione como um sensor de oxigênio nos vasos sanguíneos modulando o tônus vascular (11) e produção de eritropetina (12) de acordo com a tensão de oxigênio no sangue e interstício.

A enzima NADPH oxidase foi originalmente descrita em fagócitos, porém muitas de suas subunidades foram identificadas em tecidos vasculares animais e humanos. (13) Sua forma fagocítica é composta por dois componentes de membrana (gp91phox e p22phox) que constituem o citocromo b558, e quatro subunidades citoplasmáticas (p47phox, p67phox, p40phox e proteína Rac ligante de GTP). Quando ativada, a subunidade p47phox é fosforilada, reúne-se às outras subunidades citoplasmáticas e este complexo transloca-se para a membrana celular formando o “complexo NADPH oxidase”. (14) A gp91 phox ou Nox 2 constitui a subunidade catalítica e foi a primeira a ser descrita. É composta por quatro resíduos de histidina que participam da ligação entre dois radicais hemes, envolvidos no transporte de elétrons para o oxigênio. Sua porção citossólica contém sítios de ligação para FAD e NADPH e regiões que interagem com os componentes p47phox e p67phox. (13)

O componente p22phox forma a subunidade α do citocromo b558 e encontra-se estreitamente associado à Nox 2 na razão 1:1, estabilizando-a. Além disso participa na ligação às subunidades organizadoras citoplasmáticas (p47 e p67 phox) para a ativação da enzima.

A enzima NADPH oxidase responde a estímulos como fatores de crescimento, citocinas, endotelina-1, angiotensina-2, ácidos graxos livres, porém é sugerido que um componente genético poderia modular esta resposta.

A NADPH oxidase não-fagocítica apresenta características distintas em relação à fagocítica. Sua produção de O_2^- ocorre continuamente e em taxas pequenas (nanomolar) e sua ativação ocorre em minutos a horas, enquanto nos leucócitos, a produção de O_2^- ocorre em

picos, em taxas maiores (micromolar) e sua ativação ocorre em segundos. (14) Nos fagócitos, a formação de O_2^- pela NADPH oxidase determina a formação do ácido hipocloroso que possui ação bactericida.

Componentes da NADPH oxidase foram identificados em células vasculares e renais em animais e humanos.

Estudos em animais demonstraram a presença do componente p22phox em células endoteliais (15, 16) e musculares lisas (17,18) coronarianas, nos vasos sanguíneos renais próximos à macula densa (19), nos túbulos contornados distais e coletores. (19)

Em humanos foi demonstrada a expressão do p22phox em células endoteliais (20) e musculares lisas (20) do coronárias ateroscleróticas, nos podócitos (21) e nas células mesangiais. (22) Estudo em humanos, avaliando safenas e artérias mamárias de pacientes submetidos a revascularização miocárdica cirúrgica, evidenciou a expressão de mRNA e proteína do p22phox em vasos sanguíneos com a mesma estrutura molecular presente em fagócitos. (23)

O ânion O_2^- pode causar dano celular direto além da ativação de vias de sinalização celulares envolvidas em inflamação e fibrose, além de inativar o óxido nítrico (NO) derivado do endotélio. Como consequência, desenvolve-se disfunção endotelial, considerada a alteração mais precocemente detectável nas doenças vasculares.

Estresse oxidativo é definido como o estado de desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes. Apresenta como consequências, danos a proteínas, carboidratos, lipídios e DNA celular.

Estudos clínicos em pacientes com DM 1 demonstraram relação direta entre os níveis de hiperglicemia cronicamente mantida e o desenvolvimento de complicações crônicas. (24) O aumento da glicose intracelular é determinante do dano tecidual causado pelo diabetes e a participação do estresse oxidativo neste processo é de grande importância. Acredita-se que possa participar como fator desencadeante ou perpetuador do dano celular.

As EROs produzidas na parede vascular estão envolvidas em vários eventos celulares como mitose, apoptose, migração, hipertrofia e modificação de matriz extracelular, alterações na transcrição gênica e síntese protéica. (13) Adicionalmente podem funcionar como mediadores da memória celular à hiperglicemia. Células endoteliais e retinianas humanas expostas a hiperglicemia *in vitro*, mantinham níveis elevados de marcadores de estresse

oxidativo como proteína quinase C (PKC)- β e subunidade p47phox da NADPH oxidase, mesmo após normalização dos níveis glicêmicos. (25)

A auto-oxidação da glicose também é capaz de gerar radicais livres. Postula-se que o ânion O_2^- mitocondrial atue como um fator iniciador de uma cascata de eventos que resulta em maior produção de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) através da ativação do NFkB com produção de citocinas inflamatórias, ativação da PKC e da NADPH oxidase. A ativação da PKC regula uma série de funções vasculares como permeabilidade vascular, contratilidade, proliferação celular, síntese de matriz extracelular e transdução de sinais para produção de citocinas.

Adicionalmente, no endotélio de pacientes diabéticos, a NOS pode desviar a produção de NO para gerar O_2^- em condições de deficiência de l-arginina ou tetrahydropterina. (26) Quando ambos são produzidos ocorre formação de peroxinitrito (NOO^-), causador de dano a estruturas celulares. (27)

Em situações normais, a presença de EROs induz a expressão de enzimas antioxidantes como mecanismo de defesa, fato observado em fibroblastos de pacientes com DM1 sem nefropatia quando expostos à hiperglicemia. Entretanto, em fibroblastos de pacientes diabéticos tipo 1 com nefropatia clínica, a exposição à hiperglicemia levou ao aumento da peroxidação lipídica e não houve aumento compensatório no nível das enzimas antioxidantes Cu-Zn superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. (28)

Marra *et al* demonstraram que diabéticos tipo 1 sem complicações crônicas e com curta duração de doença apresentaram menores capacidade antioxidante do plasma e níveis de ácido úrico e maior formação de hidroperóxidos lipídicos comparados a não diabéticos (29) sugerindo que o estresse oxidativo ocorre precocemente nos pacientes com DM1.

1.1.2 Papel do sistema renina-angiotensina (SRA)

O SRA é uma cascata enzimática iniciada pela conversão do angiotensinogênio em angiotensina-1 através da ação da renina, a qual é convertida em angiotensina-2 pela enzima conversora da angiotensina-1 (ECA). A angiotensina-2, através de sua atuação sobre receptores AT1, é a principal responsável pelos efeitos do SRA no dano tecidual induzido pelo diabetes, e maior produção tecidual deste hormônio ocorre na presença de hiperglicemia. (30)

A angiotensina-2 representa um potente agente pró-inflamatório promovendo aumento do estresse oxidativo via ativação da NADPH oxidase. A elevação crônica deste hormônio foi acompanhada por um estado pró-inflamatório/pró-fibrótico envolvendo remodelamento vascular e miocárdico em animais. (31)

Osei *et al* demonstraram que indivíduos saudáveis, quando expostos a hiperglicemia, apresentam maior fluxo plasmático renal, devido à indução de vasodilatação. Este efeito foi potencializado pela inibição da ECA, sem alterar a atividade de renina plasmática, sugerindo ativação intra-renal do SRA durante hiperglicemia. Adicionalmente, a infusão de angiotensina-2 durante hiperglicemia levou à diminuição do fluxo plasmático renal. (32)

Sabe-se que a instituição da terapia anti-hipertensiva tem um papel importante na redução da progressão da nefropatia diabética e agentes que bloqueiam o SRA são particularmente importantes como agentes renoprotetores. (33)

1.2 Polimorfismos Genéticos

Define-se polimorfismo genético como a ocorrência de uma variação genética, dentro de uma mesma espécie, de duas ou mais formas em proporções que não poderiam ser mantidas apenas por uma mutação recorrente. Aparece em pelo menos 1% da população. Exemplos de polimorfismos genéticos incluem grupo sanguíneo ABO, fator Rh e o sistema HLA.

A mudança em apenas um único nucleotídeo é chamada polimorfismo de único nucleotídeo ou *Single nucleotide polymorphism* (SNP). Pode ocorrer em regiões não codificadoras do DNA no qual não haverá produto protéico alterado (polimorfismos neutros) ou em regiões codificadoras, resultando em uma mutação *missense*, na qual ocorre troca do aminoácido formado, ou *nonsense*, na qual é introduzido um códon de parada. Existem duas possíveis formas de trocas de bases: transição (troca de purina por purina A-G ou pirimidina por pirimidina C-T) e transversão (troca entre purina e pirimidina).

Os polimorfismos de restrição de fragmento (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*-RFLP) criam novos ou excluem antigos sítios para enzimas de restrição (endonucleases bacterianas). Estas enzimas clivam o DNA *in vitro* resultando na produção de fragmentos de diferentes tamanhos posteriormente detectados por eletroforese.

Outro tipo de polimorfismo caracterizado por grande número de duplicações ou deleções de pares de base é chamado *Copy Number Polymorphism* (CNP).

A expressão fenotípica e atividade de enzimas como a ECA e a NADPH oxidase são determinadas por diferentes fatores endógenos como níveis pressóricos e homeostase de sódio e presença de citocinas, respectivamente. Entretanto, polimorfismos podem influenciar a resposta fisiológica destas enzimas aos estímulos.

Os principais objetivos da análise de polimorfismos genéticos são identificar indivíduos sob risco de desenvolver determinada patologia geneticamente determinada e possibilitar a compreensão de mecanismos fisiopatológicos de determinadas doenças.

1.2.1 O polimorfismo C242T do gene do componente p22phox da NADPH oxidase

O gene codificador da subunidade p22phox da NADPH oxidase, denominado gene CYBA, é localizado no cromossomo 16q24 e possui alguns polimorfismos alélicos, entre eles, C242T, C549T, G508A e A640G. (23, 18) A frequência dos alelos varia entre diferentes etnias.

A presença da mutação C→T na posição 242 do gene do p22phox determina o polimorfismo genético C242T, com genótipos possíveis CC, CT e TT. Esta mutação resulta em um sítio de digestão pela enzima de restrição *Rsa I*. A digestão do produto amplificado (348 bp) gera dois fragmentos menores (160 bp e 188 bp) na presença da mutação. (23) Na variante C242T do p22 phox ocorre troca de histidina-72 por tirosina no sítio de ligação do heme. (34)

1.2.2 Estudos com polimorfismo C242T do gene do p22phox

Estudos clínicos realizados em pacientes não diabéticos de diferentes etnias mostraram que a presença do alelo T foi associada, em caucasianos, a maior risco de doença arterial coronariana (DAC) em homens jovens (35) e em indivíduos com início mais precoce e mais grave da doença (36) além de maiores níveis de pressão arterial sistólica (PAS) e menor complacência de pequenas e grandes artérias. (37)

Em contraste, outros estudos associaram a presença do alelo T a possível proteção cardiovascular. A presença do alelo T foi associada a menor atividade da NADPH oxidase em

veias humanas de indivíduos com DAC (38), e menor prevalência de DAC (23, 39) e AVC isquêmico embólico (40) em japoneses. A presença do alelo C foi mais prevalente em pacientes com HAS essencial e aqueles portadores do genótipo CC apresentavam maior atividade da NADPH oxidase em fagócitos. (41) Além disso, a avaliação da vasodilatação de artérias epicárdicas *in vivo* em pacientes submetidos a coronariografia diagnóstica, mostrou que portadores do genótipo CC apresentavam menor resposta dilatadora dependente do endotélio em artérias normais e ateroscleróticas, independente da presença de outros fatores de risco para aterosclerose. (42)

Outros estudos, porém, não evidenciaram associação entre o polimorfismo C242T do p22phox e risco de doença cardiovascular (43, 44, 45) ou presença de fatores de risco cardiovasculares (46) em pacientes de diferentes etnias.

Os estudos sobre polimorfismo C242T do p22phox em diabéticos tipo 2 também apresentam resultados conflitantes. Em japoneses portadores de DM2 a presença do genótipo CC foi associada à nefropatia diabética (47) e maior espessura íntima-média de carótida. (48) Em contrapartida, a presença do alelo T foi associada a maior risco de nefropatia clínica entre diabéticos tipo 2 tabagistas, em estudo brasileiro, sugerindo uma interação gene-ambiente no desenvolvimento desta complicação. (49)

Outros estudos em diabéticos tipo 2 de diferentes etnias, entretanto, falharam em mostrar associação entre polimorfismo C242T do p22phox e o desenvolvimento de nefropatia (49,50) porém sugerem que a presença do alelo T confere proteção contra DAC. (51)

Em pacientes com DM1, os resultados de um estudo clínico sugerem que o sistema NADPH oxidase pode contribuir para a patogênese da nefropatia diabética. A presença do genótipo TT foi mais freqüente em portadores de nefropatia quando comparados aos pacientes somente com retinopatia ou àqueles sem complicações. (34)

1.2.3 O polimorfismo I/D do gene da enzima conversora de angiotensina-1 (ECA)

O polimorfismo I/D da ECA é responsável por metade da variabilidade fenotípica da enzima. (52) O fragmento de 286 pares-base inserido no intron 16 do gene codificador da ECA, que caracteriza do alelo I, parece regular negativamente a expressão do gene. Logo, indivíduos portadores do genótipo DD, no qual a sequência silenciosa está ausente, têm níveis

séricos de atividade da ECA cerca de duas vezes maior que os portadores do genótipo II. (52, 53)

1.2.4 Estudos com polimorfismo I/D do gene da ECA

Diversos estudos clínicos em indivíduos de diferentes etnias avaliaram o papel do polimorfismo I/D da ECA no desenvolvimento de doença cardiovascular.

Entre pacientes hipertensos não diabéticos, este polimorfismo pode significar um marcador genético potencial de risco de complicações renais (54,55) e naqueles com doença vascular periférica, a atividade da ECA foi menor em portadores do genótipo II comparados a DI e DD. (56)

A presença do alelo D foi associada à evolução para infarto agudo do miocárdio (IAM) em pacientes com estenose coronariana. (57) Em contraste, em indivíduos jovens saudáveis, avaliados por tomografia com emissão de pósitrons não foi encontrada associação entre genótipo da ECA e reatividade miocárdica, um indicador precoce de aterosclerose. (58)

Em pacientes com DM2, diversos estudos foram conduzidos no intuito de identificar o polimorfismo I/D como marcador genético para desenvolvimento de complicações crônicas e presença de fatores de risco cardiovascular.

Nestes pacientes, a presença do genótipo DD esteve associada a maiores níveis de pressão arterial sistólica e diastólica (PAD) comparados à presença do genótipo II mas não à presença de outros parâmetros de síndrome metabólica e resistência insulínica. (59, 60)

Estudo brasileiro mostrou que a presença do alelo D foi associada a risco para nefropatia incipiente e clínica em pacientes com menos de 10 anos de duração de diabetes (61). Outros estudos não mostraram associação entre os genótipos da ECA e presença de complicações microvasculares em diabéticos tipo 2. (62)

Em diabéticos tipo 1, o polimorfismo I/D do gene da ECA parece afetar o prognóstico da doença renal e influenciar a resposta às drogas bloqueadoras do SRA. (63, 64) Há evidências de que o SRA é altamente ativo durante hiperglicemia na circulação renal do DM1 sendo estas alterações hemodinâmicas renais mais intensas em pacientes que carregam o alelo D em comparação aos com genótipo II. (63)

Nestes pacientes, o polimorfismo I/D esteve associado à presença de nefropatia clínica (32), queda da taxa de filtração glomerular (65, 66), maior pressão arterial diastólica média

nas 24 horas e menor variação diurna da pressão arterial (67), maiores níveis noturnos de PAS, PAD e pressão arterial média (PAM) e menor descenso noturno da PAD e PAM (68), maior resposta de pressão arterial e hemodinâmica renal à angiotensina-1 (69), e risco de doença renal terminal em pacientes com nefropatia diabética. (70)

A influência do polimorfismo I/D da ECA na resposta terapêutica com inibidores da ECA e bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina-2 (BRA) tem sido alvo de estudos. A hipertensão glomerular no diabetes é influenciada pela vasodilatação pré-glomerular provocada pela hiperglicemia e pela resistência pós-glomerular dependente de angiotensina-2. Baseado neste princípio, questiona-se a influência do polimorfismo do gene da ECA sobre a resposta às drogas inibidoras do SRA, entretanto os resultados são ainda conflitantes. (63, 71,72)

Com base no conhecimento de que EROs geradas pelo sistema NADPH oxidase e alterações hemodinâmicas mediadas pelo SRA apresentam importante papel na patogênese da doença vascular no diabetes, e que esta representa a base fisiopatológica das complicações crônicas da doença, a interação entre os polimorfismos I/D da ECA e C242T do p22phox poderia contribuir para o risco geneticamente determinado de complicações crônicas e aglomeração de fatores de risco cardiovascular em pacientes com diabetes tipo 1.

2 OBJETIVOS

2.1- Avaliar a associação entre os polimorfismos I/D do gene da ECA e C242T do gene do p22phox , isoladamente e em combinação, e a presença de complicações crônicas microvasculares do diabetes (nefropatia e retinopatia diabéticas) e hipertensão arterial em pacientes com DM1.

2.2- Avaliar a associação entre os polimorfismos I/D do gene da ECA e C242T do gene do p22phox e a presença de fatores de risco cardiovascular em pacientes com DM1.

2.3- Comparar a frequência da distribuição dos polimorfismos I/D do gene da ECA e C242T do gene do p22phox entre diabéticos tipo 1 e controles não diabéticos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional de corte transversal. O protocolo do estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) (projeto 1664 - CEP/HUPE).

3.2 População

3.2.1 Pacientes

Os pacientes participantes do estudo são diabéticos tipo 1 em acompanhamento clínico e tratamento no Serviço de Diabetes do HUPE. O diagnóstico de DM1 foi definido de acordo com os critérios da Associação Americana de Diabetes e Sociedade Brasileira de Diabetes que incluem idade menor que 40 anos ao diagnóstico, história de cetoacidose diabética ou cetonemia, uso obrigatório de insulina sem interrupção desde o diagnóstico. Os critérios de inclusão foram diagnóstico de diabetes tipo 1, acompanhamento regular no ambulatório e aceitação e cumprimento do protocolo do estudo.

3.2.2 Controles

Os controles são jovens, não diabéticos de diferentes classes sociais, incluindo alunos e funcionários da UERJ, médicos residentes e candidatos a doadores de medula óssea captados durante campanha de doação na UERJ, que aceitaram participar do estudo. Os dados referentes a idade, sexo e cor da pele foram obtidos através de questionário preenchido pelo indivíduo.

3.3 Avaliação clínica dos pacientes diabéticos

Todos os pacientes foram submetidos a inquérito clínico-demográfico no qual são apurados dados relativos a sexo, idade (anos), idade ao diagnóstico (anos), cor da pele (branca ou não branca), tempo de duração de diabetes (anos), história de tabagismo atual ou prévio, história familiar de DM2 em parentes de primeiro grau, dose diária de insulina, exame físico completo e avaliação laboratorial. Durante a avaliação, os pacientes não apresentavam sinais clínicos ou laboratoriais de infecção ou doenças hepáticas.

A pressão arterial foi determinada com o paciente em posição supina após 15 minutos de repouso. Baseado nos critérios do JNC VII (73), hipertensão arterial foi definida como pressão arterial sistólica (PAS) ≥ 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg, em adultos, quando as aferições anormais se repetissem em duas ou mais consultas. Para adolescentes foi utilizada a tabela de percentil para sexo, idade e altura sendo os valores de pressão arterial diastólica e/ou sistólica \geq percentil 95 considerados hipertensão, medidos no mínimo em três ocasiões diferentes. (74) Foi utilizado um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio padronizado e calibrado e manguitos de tamanhos recomendados. A PAS foi determinada pelo aparecimento dos sons de Korotkoff e a PAD pelo seu desaparecimento. Foram calculadas, a partir destes dados, as médias aritméticas das aferições realizadas em três visitas ao Hospital, obtendo-se as médias de PAS e PAD.

O índice de massa corporal (IMC) foi calculado dividindo-se a massa corporal (kg) pelo quadrado da altura (m^2). Foram utilizadas as curvas desenvolvidas pelo CDC (*Center for Disease Control*) nos indivíduos com até 17 anos para definição de sobrepeso (\geq percentil 85) e obesidade (\geq percentil 95). Nos indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos, foi utilizado como critério de sobrepeso e obesidade um IMC igual ou superior a 25 kg/m^2 e 30

kg/m², respectivamente. A circunferência da cintura foi mensurada no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca e a circunferência do quadril no ponto mais largo ao redor dos trocânteres maiores, ambas com o paciente em posição ortostática. Foi calculada a relação cintura/quadril através da divisão dos dois valores obtidos.

A avaliação da retina foi realizada pelo serviço de oftalmologia do HUPE por oftalmoscopia indireta sob efeito de medicação midriática tópica. O resultado de exame de fundoscopia foi classificado em normal, presença de retinopatia não proliferativa e retinopatia proliferativa, utilizando-se para diagnóstico o olho mais afetado.

3.4 Avaliação laboratorial dos pacientes diabéticos

Após jejum de 12h, foi realizada coleta de sangue venoso, para análise por método enzimático e colorimétrico (Cobas Mira Roche) da glicemia, creatinina sérica, colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídeos. O paciente foi instruído a realizar sua refeição habitual, aplicar a dose prescrita de insulina, permanecer em repouso e retornar ao laboratório após duas horas para nova coleta de sangue para determinação da glicemia pós-prandial. A hemoglobina glicada (HbA1c) foi determinada por HPLC (Hitachi L-9100), cujo valor de referência é de 2,6 a 6,2%. A determinação de proteína C-reativa foi por nefelometria, com valor de referência $\leq 0,3$ mg/dL e coeficientes de variação intraensaio de 0,34% e inter-ensaio de 0,53%. O LDL-colesterol foi calculado pela fórmula de Friedewald [LDL= colesterol total - (HDL + Triglicerídios/5)] quando os valores de triglicerídios não ultrapassassem 400 mg/dl. (75)

Amostra de urina noturna foi coletada em recipiente limpo sem preservativos iniciada às 20h do dia anterior e guardada na geladeira até às 6h da manhã do dia de entrega ao laboratório. Este procedimento foi repetido três vezes com intervalo mínimo de uma semana entre cada coleta em um período máximo (entre a primeira e a última coleta) de seis meses. Os pacientes foram orientados a evitar esforço físico, ingestão excessiva de proteínas e relação sexual no dia da coleta de urina. No momento da entrega foram colhidas amostras de urina para a realização de Multistix® (Bayer, Diagnostics), urinálise e urinocultura. Sedimento urinário normal (valores normais de hemácias, hemoglobina, leucócitos, cilindros e reação de nitrito negativa) foi usado como critério para exclusão de outras patologias do trato urinário.

As dosagens da concentração urinária de albumina foram realizadas por imunoensaio enzimático de quimioluminescência (Immulite 1000 Systems, DPC Medlab, Los Angeles, CA, sensibilidade de 0.9 µg/ml) com coeficiente de variação intradosagem e interdosagem de 2.4% e 5.7 %, respectivamente. Foi então determinada a taxa noturna de excreção urinária de albumina (EUA) através da seguinte fórmula: $EUA (\mu\text{g}/\text{min}) = \text{volume urinário (ml)} \times \text{concentração de albumina}(\mu\text{g}/\text{ml}) / 600(\text{min})$. Consideramos micro e macroalbuminúria valores de EUA respectivamente de 20 a 199 µg/min e $\geq 200 \mu\text{g}/\text{min}$ em pelo menos duas de três amostras consecutivas. Nos pacientes em uso de inibidores da ECA ou bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina, foram considerados os valores de EUA prévios ao início da medicação para classificação da albuminúria. Foi considerada presença de nefropatia o diagnóstico de micro ou macroalbuminúria ou queda da taxa de filtração glomerular ($< 60 \text{ ml}/\text{min}$).

Em pacientes com idade superior a 16 anos, a taxa de filtração glomerular (TFG) foi estimada pela equação de Cockcroft e Gault [$TFG (\text{ml}/\text{min}) = (140 - \text{idade em anos}) \times \text{peso em Kg} \times (0,85 \text{ se mulher}) / 72 \times \text{Creatinina sérica (mg/dl)}$] (76). Em pacientes menores de 16 anos foi utilizada a fórmula de Schwartz [$TFG (\text{ml}/\text{min}) = 0,55 \times \text{altura em cm} / \text{creatinina sérica (mg/dl)}$]. (77)

3.5 Coleta e extração do DNA

O DNA foi isolado de linfócitos de sangue periférico, após centrifugação, através de técnica de extração padronizada utilizando *GFX Genomic Blood DNA Purification Kit* da Amersham Biosciences seguindo protocolo preconizado pelo fabricante.

3.6 Preparo da cuba de eletroforese e do gel de agarose

O gel de agarose a 1% foi preparado através da adição de 0,3 g de agarose a 30 mL de solução tampão de eletroforese (TBE 1x) e aquecido no micro-ondas até dissolução completa da agarose. Após este processo foi então adicionado 0,5 µL de brometo de etídeo 10mg/ml. A solução obtida foi então despejada na bandeja de eletroforese e o pente escolhido posicionado. Em seguida à geleificação e retirada cuidadosa do pente, a bandeja foi colocada

na cuba (Horizon 58-Gibco BRL) e foi adicionado tampão TBE 1X até a submersão completa do gel. O gel de agarose a 2% foi preparado através das etapas anteriores porém com diferente quantidade de agarose (0,6g).

3.7 Aplicação das amostras no gel e corrida de eletroforese

As amostras obtidas após a realização de reação de polimerase em cadeia (PCR) (para análise do polimorfismo da ECA) e PCR seguida de restrição (para análise do polimorfismo C242T do p22phox) foram introduzidas nos poços formados pelo pente no gel de agarose. A corrida eletroforética foi realizada 100 volts por 10 a 20 minutos. Após este período, o gel foi retirado e transferido para visualização das bandas correspondentes ao DNA em transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo TM-20) e fotografado utilizando-se um sistema de registro de imagens (Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System) para posterior análise.

3.8 Análise do polimorfismo I/D da ECA

3.8.1 Amplificação da região genômica contendo o polimorfismo I/D

A amplificação foi realizada através da reação de PCR que tem como principal objetivo produzir um número amplificado de cadeias de um determinado fragmento gênico. Utilizou-se a enzima taq – polimerase, extraída da bactéria *Thermus aquaticus.*, capaz de sintetizar DNA no sentido 5' \Rightarrow 3' a partir de seus precursores desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP).

A reação de PCR é composta por ciclos: Fase de desnaturação, onde ocorre o desenrolamento da fita dupla do DNA através da quebra das pontes de hidrogênio entre as bases pareáveis (A – T, G – C), dando origem a duas fitas simples de DNA sobre as quais a síntese posteriormente vai ocorrer; Fase de hibridização, quando os *primers* se ligam à suas sequências homólogas no DNA e a Fase de extensão do DNA, onde ocorre a síntese de uma nova fita.

O Protocolo para realização da PCR para análise deste polimorfismo foi composto pelas seguintes etapas:

1) Preparação do MIX (20 μ L para cada amostra de 5 μ L de DNA a uma concentração de 10ng/ μ L)

As quantidades, por amostra de DNA, dos componentes de preparação do MIX foram:

Primer F da ECA (10 μ M) : 0,5 μ L

Primer R da ECA (10 μ M) :0,5 μ L

Tampão Invitrogen[®] para PCR 10x :2,5 μ L

dNTP Invitrogen[®] (10 mM) :0,5 μ L

MgCl₂ Invitrogen[®] (50 mM) :1,0 μ L ou 0,75 μ L

Enzima Taq DNA-polimerase Invitrogen Platinun (Invitrogen[®]) (5U/ μ L) :0,1 μ L

Água reagente tipo 1 – x μ L (x= quantidade para completar com água até atingir 20 μ L por amostra)

Sequência de nucleotídeos do *primer* da ECA:

<p>5' CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT 3' 5' GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT 3',</p>

2) Uma quantidade de 20 μ L do MIX foi colocada em cada valeta da placa de PCR seguida da adição de 5 μ L de DNA. Uma amostra controle negativa, contendo somente MIX sem DNA, foi utilizada.

3) Colocação da placa no termociclador coberta com papel alumínio. As condições da PCR foram as seguintes:

29 ciclos- etapas 2,3 e 4

1-Denaturação inicial- 96° C: 5 minutos

2-Denaturação- 95° C: 1 minuto

3-Anelamento- 64° C: 1 minuto

4-Extensão- 72° C: 1minuto e 30 segundos

5-Extensão final - 72° C: 10 minutos

3.8.2 Eletroforese em gel de agarose a 1%

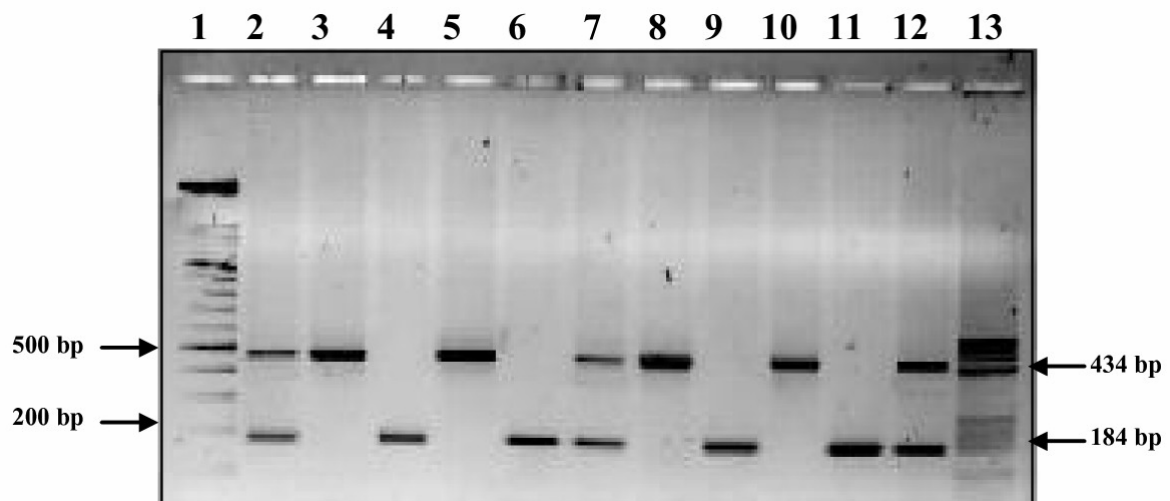
Para análise dos produtos de PCR, 15µL de cada amostra foram retirados de cada valeta e adicionados a 1 ou 2 µL de corante azul de bromofenol em um parafilm. O azul de bromofenol foi preparado a partir da adição de 4 ml de glicerol 40%, 0,25% de bromofenol blue, água miliQ até completar 10 ml de solução.

O material obtido foi então introduzido nas valetas do gel de agarose a 1%. A corrida eletroforética foi realizada a 100 V por 10 a 20 minutos. Após a corrida, as placas foram desmontadas e o gel foi retirado. As faixas foram, então, visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo TM – 20). Os géis foram fotografados utilizando-se um sistema de registro de imagens (Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System).

3.8.3 Visualização da bandas

A visualização das bandas e classificação dos genótipos foi realizada a partir da análise das fotografias dos géis de eletroforese em filme polaróide. A distribuição dos genótipos conforme o número de pares de base das bandas é mostrada na figura 1.(adaptado da referência 78)

Figura 1- Exemplo de distribuição dos genótipos I/D ECA em fotografia de gel de eletroforese (78)



Linha 3: genótipo II ; Linha 4: genótipo DD; Linha 7: genótipo DI

3.9 Análise do polimorfismo C242T do p22phox

A análise do polimorfismo C242T foi feita através da metodologia de PCR-RFLP. A região genômica contendo o polimorfismo de interesse foi amplificada por PCR utilizando DNA genômico como molde. A presença do polimorfismo é caracterizada após digestão dos amplicons com a enzima *RSA I*, seguida de análise eletroforética dos produtos de digestão gerados em gel de agarose a 2%.

3.9.1 Amplificação da região genômica contendo o polimorfismo C242T

O Protocolo para realização da PCR para análise deste polimorfismo foi composto pelas seguintes etapas:

1) Preparação do MIX (20 μ L para cada amostra de 5 μ L de DNA a uma concentração de 10ng/ μ L)

As quantidades, por amostra de DNA, dos componentes de preparação do MIX foram:

Primer F do p22phox (10 μ M): 0,5 μ L

Primer R do p22phox (10 μ M) :0,5 μ L

Tampão Invitrogen[®] para PCR 10x: 2,5 μ L

dNTP Invitrogen® (10 mM) :0,5 µL

MgCl₂ Invitrogen® (50 mM): 1,0 µL

Enzima Taq DNA-polimerase Invitrogen Platinun (Invitrogen®) (5U/µL): 0,1 µL

Água reagente tipo 1 – x µL (x= quantidade para completar com água até atingir 20 µL por amostra)

Sequência de nucleotídios do primer do p22phox:

5'-TGCTTGTGGGTAAACCAAGGCCGGTG-3' (F1)
5' -AACACTGAGGTAAGTGGGGGTGGCTCCTGT-3' (R1),

2) Uma quantidade de 20 µL do MIX foi colocada em cada valeta da placa de PCR seguida da adição de 5 µL de DNA. Uma amostra controle negativa, contendo somente MIX sem DNA, foi utilizada.

3) Colocação da placa no termociclador coberta com papel alumínio. As condições da PCR foram as seguintes:

35 ciclos- etapas 2,3 e 4

1-Denaturação inicial- 94° C: 2 minutos

2-Denaturação- 94° C: 1 minuto

3-Anelamento- 59° C: 50 segundos

4-Extensão- 72° C: 50 segundos

5-Extensão final - 72° C: 3 minutos

3.9.2 Digestão dos produtos de amplificação pela enzima *RSA I*

A análise da substituição C242T do gene do p22phox foi feita através da digestão do produto de PCR com a enzima de restrição *Rsa I* 100U/µL específica para esta sequência (Invitrogen catálogo 15424-013). O processo de digestão foi composto pelas seguintes etapas:

1) Utilização de 15 µL do MIX composto por tampão da enzima de restrição (2 µL por amostra) + Enzima *Rsa I* (0,5µL por amostra)+ água miliQ (12,5 µL por amostra até completar 15 µL).

2) Ao MIX foram adicionados 5 μ L do material amplificado por PCR, colocados em tubo eppendorf e deixado a 37 graus celsius por pelo menos 4 horas em banho-maria ou no termociclador.

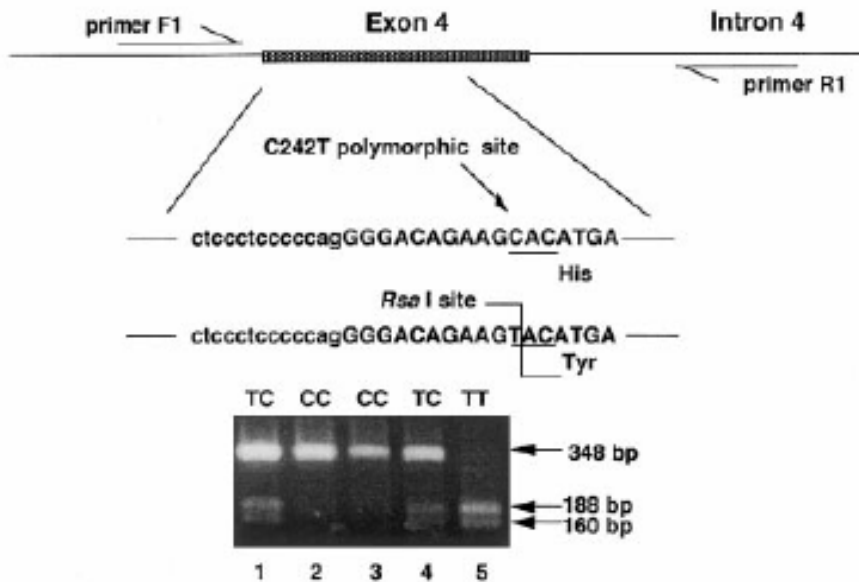
3.9.3 Eletroforese em gel de agarose a 2%

Para análise dos produtos de digestão, 15 μ L de cada amostra foram retirados de cada valeta e adicionados a 1 ou 2 μ L de corante azul de bromofenol em um parafilm. O material obtido foi então introduzido nas valetas do gel de agarose a 2%. A corrida eletroforética foi realizada a 100 V por 10 a 20 minutos. Após a corrida, as placas foram desmontadas e o gel foi retirado. As bandas foram, então, visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo TM – 20). Os géis foram fotografados utilizando-se um sistema de registro de imagens (Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System).

3.9.4 Visualização da bandas

A identificação dos genótipos foi realizada a partir da observação das fotografias dos géis de eletroforese. A distribuição das bandas conforme o número de pares de base é mostrada na figura 2. (23)

Figura 2- Exemplo de distribuição dos genótipos do polimorfismo C242T p22phox em fotografia de gel de eletroforese. (adaptado da referência 23)



3.10 Avaliação da frequência alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) é a base da genética de populações e define o equilíbrio estacionário para os gens de uma espécie, ou seja, as frequências alélicas permanecerão constantes ao longo das gerações. Considerando dois alelos, A e a de um mesmo loco gênico, com frequências p e q , respectivamente, na população. A frequência esperada do genótipo AA é p^2 , Aa $2pq$ e aa q^2 . Para testar o desvio do equilíbrio H-W é usado teste Chi-quadrado de Pearson usando as frequências observadas dos genótipos obtidas dos dados e as frequências genotípicas esperadas obtidas usando-se o princípio H-W.

3.11 Análise Estatística

Os dados foram armazenados e analisados através do SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows, versão 13.0.

As variáveis contínuas são expressas em média +/- desvio-padrão (DP) ou mediana (intervalo interquartil) se apresentem ou não distribuição normal, respectivamente. Variáveis categóricas são expressas como número de casos (percentual). Após verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg em diabéticos e controles, foram comparadas as distribuições dos polimorfismos nos dois grupos, através de testes qui-quadrado independentes. A associação entre distribuição alélica e presença de retinopatia, nefropatia e hipertensão arterial foi analisada através de teste qui-quadrado, porém quando havia violação do pressuposto do método, foi utilizado teste exato de Fisher. Teste t-student ou teste não paramétrico Mann-Whitney foram usados para comparação dos genótipos e combinações em relação aos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes que apresentassem distribuição normal ou desviada, respectivamente. Modelo de regressão linear foi utilizado para correção para variáveis de confundimento. Um valor de p-bicaudal $< 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

De um total de 136 pacientes diabéticos tipo 1 acompanhados no ambulatório, foram selecionados 103 pacientes que cumpriram o protocolo de rastreamento de complicações crônicas (nefropatia e retinopatia) e foram avaliados quanto à determinação de ambos os polimorfismos I/D da ECA e C242T do p22phox. Os pacientes excluídos (n=33) e incluídos apresentavam características semelhantes quanto ao sexo, idade, idade diagnóstica, cor da pele , duração do diabetes e história de tabagismo atual ou prévio (tabela 1).

Tabela 1- Dados clínicos e demográficos dos pacientes diabéticos tipo 1 excluídos e incluídos no estudo.

	Pacientes excluídos	Pacientes incluídos
	n=33	n=103
Sexo feminino n (%)	20 (60,2)	53 (51,5)
Idade ao diagnóstico (anos)	13 (8,5-21)	13 (9-20)
Cor branca n (%)	17 (51,5)	65 (63,1)
Idade (anos)	28,8 ± 11,6	28,8 ± 10,6
Duração do diabetes (anos)	9 (5-16)	12 (7-18)
Tabagistas/ex-tabagistas n(%)	8 (24,2)	17 (16,5)

Valores das variáveis contínuas apresentados como média ± desvio-padrão ou mediana (intervalo interquartil) conforme distribuição normal ou não, respectivamente.

As tabela 2 e 3 apresentam os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo, respectivamente.

Tabela 2- Dados clínicos dos pacientes diabéticos tipo 1 incluídos no estudo.

Pacientes diabéticos n=103	
Dose diária de insulina (UI/Kg)	0,81 (0,63-1,06)
PAS (mmHg)	114 (103-126)
PAD (mmHg)	71,2 ± 12,4
IMC (kg/m²)	22,65 ± 3,54
Relação C/Q	0,84 ± 0,06
Sobrepeso ou obesidade n (%)	29 (28,2)
Hipertensos n (%)	19 (18,4)
Normo/micro/macroalbuminúricos n(%)	75(72,8) / 23(22,3) / 5(4,9)
Retinopatia ausente/não proliferativa/proliferativa * n(%)	74(74,7) / 21(20,4) /4(3,9)
História família de DM2 n(%)	55 (57,9)
Uso de iECA ou BRA (%)	14 (13,6)
Uso de estatina (%)	12 (11,7)

* faltam 4 avaliações. Valores apresentados como média ± desvio-padrão ou mediana (intervalo interquartil) conforme distribuição normal ou não, respectivamente. iECA, inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA, bloqueador de receptor AT1 da angiotensina; IMC, índice de massa corporal; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; Relação C/Q, relação cintura-quadril.

Tabela 3- Dados laboratoriais dos pacientes diabéticos tipo 1 incluídos no estudo.

Pacientes incluídos n=103	
Glicemia jejum (mg/dl)	174 (108-250)
Glicemia pós-prandial (mg/dl)	227 (172-340)
HbA1c (%)	9,51 ± 2,3
Colesterol (mg/dl)	175,7 ± 32,6
Triglicerídeos (mg/dl)	71,5 (49-107)
HDL Colesterol (mg/dl)	47 (41-56)

LDL Colesterol (mg/dl)	108,9 ± 27,2
Taxa de filtração glomerular (ml/min)	115 (101-131)
Excreção urinária de albumina (µg/min)	10,3 (5,7-24,6)
Proteína C reativa (mg/dl)	0,157 (0,04-0,34)

Valores apresentados em Média ± Desvio-padrão ou mediana (intervalo interquartil) conforme distribuição normal ou não, respectivamente.

A população controle foi formada por 158 indivíduos jovens, 60% do sexo feminino, sem história de diabetes tipo 1. Este grupo foi avaliado geneticamente quanto aos polimorfismos I/D da ECA e C242T do p22phox. Não foi considerada classificação por cor pois esta foi auto-referida na maior parte dos pacientes.

As distribuições genóticas e alélicas da ECA e do p22phox de controles e diabéticos tipo 1 obedeciam ao princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg e são apresentadas, respectivamente, nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo I/D da ECA no grupo controle e nos pacientes diabéticos tipo 1.

Genótipo/Alelo	Controles (n=158)		Diabéticos tipo 1 (n=103)	
	Observada	Esperada(n)	Observada	Esperada(n)
II- n (%)	27 (17,1)	24,33	15 (14,6)	17,13
DI- n (%)	70 (44,3)	75,34	54 (52,4)	49,75
DD-n (%)	61(38,6)	58,33	34 (33)	36,13
Alelo I – frequência	0,396		0,408	
Alelo D- frequência	0,604		0,592	
Qui-quadrado	0,79		0,78	
Valor de p	0,672		0,686	

Tabela 5 – Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo C242T do p22phox no grupo controle e nos pacientes diabéticos tipo 1.

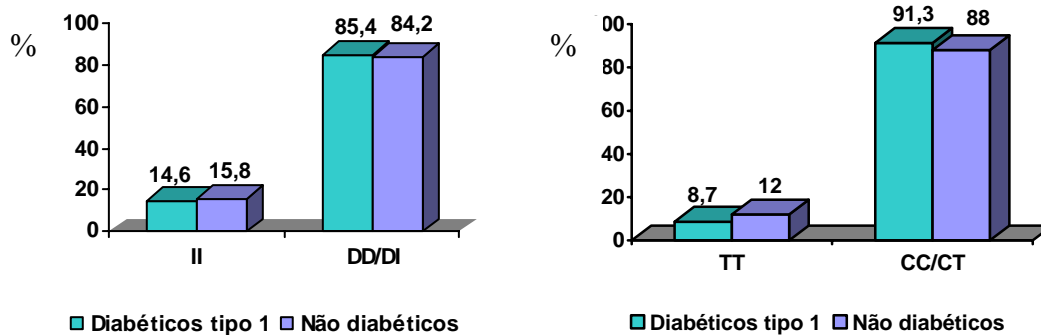
Genótipo/Alelo	Controles (n=158)		Diabéticos tipo 1 (n=103)	
	Observada	Esperada(n)	Observada	Esperada (n)

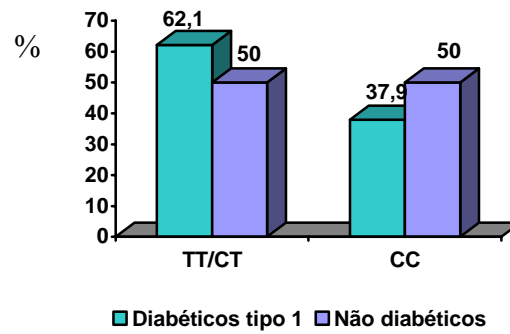
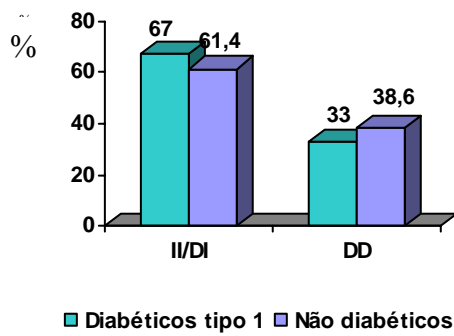
TT- n (%)	19 (12)	15,2	9 (8,7)	12,93
CT- n (%)	60 (38)	67,61	55 (53,4)	47,13
CC-n (%)	79(50)	75,2	39 (37,9)	42,93
Alelo T – frequência		0,310		0,354
Alelo C- frequência		0,69		0,646
Qui-quadrado		2,0		2,87
Valor de p		0,368		0,238

Não houve diferença significativa quanto à presença do alelo D da ECA entre diabéticos e controles (genótipo DD/DI vs II, $X^2= 0,076$; $p=0,782$) assim como do alelo I (DD vs DI/II $X^2 =0,884$ $P=0,358$).

Da mesma forma, a presença do alelo C ou T do p22phox não foi diferente entre controles e diabéticos (genótipo CC/CT vs TT, $X^2= 0,704$, $p= 0,402$ e genótipo CC vs CT/TT, $X^2=3,707$, $P=0,054$). Estes dados são apresentados no gráfico 1.

Gráfico 1- Distribuição genotípica da ECA e do p22phox entre diabéticos tipo 1 e controles





No grupo de diabéticos foi avaliada a influência dos polimorfismos da ECA e do p22phox na prevalência de complicações microvasculares (nefropatia e retinopatia), hipertensão arterial, e parâmetros clínicos e laboratoriais associados a maior risco de desenvolvimento destas complicações.

Não houve diferença quanto à presença dos polimorfismos entre pacientes portadores ou não de nefropatia. (tabelas 6), retinopatia (tabelas 7) ou hipertensão arterial (tabelas 8). Da mesma forma, a distribuição da combinação dos polimorfismos não foi diferente entre portadores de complicações ou hipertensão arterial (tabela 9).

Tabela 6-Comparação entre os portadores e não portadores de nefropatia quanto à distribuição genotípica da ECA e do p22phox.

ECA

P22phox

Genótipos n(%)	DD	DI/II	II	DI/DD	CC	CT/TT	TT	CT/CC
Sem nefropatia	22(29,3)	53(70,7)	12(16)	63(84)	30(40)	45(60)	7(9,3)	68(90,7)
Com nefropatia	12(42,9)	16 (57,1)	3(10,7)	25(89,3)	9(32,1)	19(67,9)	1(3,6)	27(96,4)
	$X^2=1,68$ p=0,194		$Fi=0,067$ p=0,499		$X^2=0,535$ p= 0,465		$Fi=0,09$ p=0,331	

Tabela 7 - Comparação entre os portadores e não portadores de retinopatia quanto à distribuição genotípica da ECA e do p22phox.

Genótipos n(%)	ECA				P22phox			
	DD	DI/II	II	DI/DD	CC	CT/TT	TT	CT/CC
Sem retinopatia	21(28,4)	53(71,6)	11(14,9)	63(85,1)	29(39,2)	45(60,8)	6(8,1)	68(91,9)
Com retinopatia	12(48)	13(52)	3(12)	22(88)	8(32)	17(68)	2(8,0)	23(92)
	$X^2=0,036$ p=0,772		$Fi=0,036$ p=0,722		$X^2=0,413$ p= 0,521		$Fi=0,002$ p=0,986	

Tabela 8- Comparação entre os portadores e não portadores de hipertensão arterial quanto à distribuição genotípica da ECA e do p22phox.

Genótipos n(%)	ECA				P22phox			
	DD	DI/II	II	DI/DD	CC	CT/TT	TT	CT/CC
Normotensos	26(31)	58(69)	13(15,5)	71(84,5)	31(36,9)	53(63,1)	6(7,1)	78(92,9)
Hipertensos	8(42,1)	11(57,9)	2(10,5)	17(89,5)	8(42,1)	11(57,9)	2(10,5)	17(89,5)
	$X^2=0,872$ p=0,351		$F_i=0,054$ p=0,581		$X^2=0,178$ p=0,673		$F_i=0,049$ p=0,619	

Tabela 9- Comparação entre a distribuição das combinações dos polimorfismos entre portadores ou não de nefropatia, retinopatia e hipertensão arterial.

	Combinação ECA + p22phox			
	DD+CC	DD+CT/TT	II/DI+CC	II/DI+CT/TT
Sem nefropatia	11(14,7)	11(14,7)	19(25,3)	34(45,3)
Com nefropatia	5(17,9)	7(25)	4(14,3)	12(42,9)
		<i>Fi=0,156</i>		
		<i>p=0,471</i>		
Sem retinopatia	12(16,2)	9(12,2)	17(23)	36(48,6)
Com retinopatia	4(16)	8(32)	4(16)	9(36)
		<i>Fh=0,233</i>		
		<i>p=0,147</i>		
Normotensos	11(13,1)	15(17,9)	20(23,8)	38(45,2)
Hipertensos	5 (26,3))	3(15,8)	3(15,8)	8(42,1)
		<i>Fi=0,148</i>		
		<i>p=0,520</i>		

Resultados apresentados como n(%)

Idade, sexo, IMC, relação cintura/quadril, dose de insulina, A1c, perfil lipídico, taxa de filtração glomerular, taxa de excreção urinária de albumina, frequência de uso de iECA ou BRA não foram diferentes conforme as distribuições alélicas. Entretanto, a duração do diabetes foi maior nos pacientes portadores do alelo D comparados àqueles com genótipo II e nos portadores do alelo T comparados aos com genótipo CC (tabela 10)

Pacientes portadores do alelo D (genótipos DD/DI) apresentaram maiores níveis de PAD comparados aos portadores do genótipo II ($72,2 \pm 12,3$ vs $65,4 \pm 11,6$ mmHg , $p=0,047$), que após correção para duração do diabetes, não permaneceu estatisticamente significativo ($p=0,14$). (tabela 10). Não houve diferença nas distribuições genótípicas em relação à cor da pele.

Tabela 10- Comparação dos dados clínico-demográficos entre as diferentes distribuições genótípicas da ECA e do p22phox

Genótipos	ECA		P22phox	
	DD vs II/DI	II vs DD/DI	CC vs CT/TT	TT vs CT/CC
Idade (anos)	30 (23,5-36,3) vs 26(20-36)	22(19-33) vs 28(21-37)	26(19-35) vs 28(21,5-37)	25(22,5-28) vs 28(20-37)
Duração do diabetes (anos)	15(7-18,5) vs 10 (7-16,5)	8(7-11) vs 12,5(7,3-18) *	9(6-15) vs 13(8-18)**	13(8-16) vs 12(7-18)
Sexo F n (%)	21 (61,8) vs 32 (46,4)	6 (40) vs 47 (53,4)	20 (51,3) vs 33 (51,6)	3 (37,5) vs 50 (52,6)
IMC (Kg/m²)	23,3 ± 3,8 vs 22,3 ± 3,4	22,7 ± 3,2 vs 22,6 ± 3,6	22,9 ± 3,6 vs 22,5 ± 3,5	20,4 ± 2,6 vs 22,8 ± 3,6
Dose de insulina (UI/kg/dia)	0,9 (0,7-1,1) vs 0,8 (0,6-1,05)	0,7 (0,5-0,99)vs 0,8 (0,7-1,1)	0,8 (0,6-1,0) vs 0,8 (0,7-1,2)	1,0 (0,5-1,1) vs 0,8 (0,6-1,06)
Relação cintura/quadril	0,84 ± 0,05 vs 0,84 ± 0,06	0,85 ± 0,04 vs 0,84 ± 0,06	0,85 ± 0,06 vs 0,83 ± 0,06	0,83 ± 0,04 vs 0,84 ± 0,06
PAS (mmHg)	116 (109-130) vs 110 (100-125)	109 (100-125)vs 114 (104-128)	109 (100-130) vs 116 (107-126)	118 (105-138) vs 113 (103-126)
PAD (mmHg)	74,0 ± 11,1 vs 69,9 ± 12,8	65,4 ± 11,6 vs 72,2 ± 12,3 †	69,6 ± 13,3 vs 72,3 ± 11,8	74,6 ± 12,2 vs 70,9 ± 12,4

* p=0,044 **p=0,046 † p=0,047 IMC=índice de massa corporal, PAS= pressão arterial sistólica, PAD=pressão arterial diastólica. Dados apresentados como média ± desvio-padrão ou mediana (intervalo interquartil) conforme distribuição normal ou desviada. Teste t ou Mann-Whitney para comparação entre variáveis contínuas com distribuição normal ou desviada, respectivamente. Teste Qui-quadrado ou Fisher para comparação entre variáveis categóricas nominais.

Pacientes portadores do alelo D apresentaram maiores níveis de Proteína C-reativa comparados aos portadores do genótipo II (0,18(0,04-0,38) vs 0,09(0,04-0,16) mg/dl; p=0,05), porém após correção para duração do diabetes não apresentou significância estatística (p=0,106). (tabela 11). Não houve diferença entre os genótipos em relação aos outros parâmetros laboratoriais.

Tabela 11- Comparação dos dados laboratoriais entre as diferentes distribuições genótípicas da ECA e do p22phox

Genótipos	ECA		P22phox	
	DD vs II/DI	II vs DD/DI	CC vs CT/TT	TT vs CT/CC
A1c (%)	9,7(8,3-10,8) vs 9,5(7,7-10,5)	9,0(7,5-11,4) vs 9,7(8,1-10,8)	9,6(7,3-11,1) vs 9,7(8,2-10,5)	10(8,5-11,7) vs 9,7(7,7-10,8)
Glicemia jejum (mg/dl)	181(113-164) vs 168(97-222)	196(155-263) vs 156(99,5-249)	174(113-246) vs 171(105-259)	258(109-301) vs 169(109-226)
Glicemia pós prandial (mg/dl)	211(187-339) vs 234(157-342)	236(192-304) vs 222(164-342)	220(167-299) vs 237(174-349)	193(124-352) vs 232(184-339)
TFG estimada (ml/min)	117(98-147) vs 113(101-130)	119(103-152) vs 114(98-131)	119(98-147) vs 112(101-129)	114(105-164) vs 115(100-131)
Colesterol total (mg/dl)	177±33,5 vs 175±32,4	166±26,5 vs 177,3±33,4	176,9±38,6 vs 174,9±28,7	154,9±28,1 vs 177,4±32,5
HDL-c (mg/dl)	49,5(41-61,3) vs 46(39,5-55,5)	47(43-50) vs 47(40-61)	47(39-61) vs 46,5(41-55)	44(39-51) vs 47(41-59)
LDL-c (mg/dl)	107,5±33,1 vs 109,5±24,1	100,9±23,6 vs 110,2±27,7	103,1±29,5 vs 112,4±25,3	99,2±19,9 vs 109,7±28,0
Triglicerídios (mg/dl)	85,7(55,8-109) vs 67,5(47-101,5)	69(46,5-130) vs 71,8(55,3-106)	75(56-123) vs 68,3(48,3-101)	65,6(43,1-141,3) vs 71,5(55-107)
Proteína C-reativa (mg/dl)	0,16(0,05-0,73)vs 0,153(0,04-0,27)	0,09(0,04-0,16) vs 0,18(0,04-0,38) #	0,16(0,05-0,43) vs 0,15(0,04-0,3)	0,12(0,02-0,24) vs 0,16(0,04-0,34)
EUA (µg/min)	10,15(5,5-45,4) vs 11(6,01-17,04)	11(6,1-16,9) vs 10,2(5,7-26,6)	10,3(4,97-16,6) vs 10,3(6,1-26,6)	7,9(3,9-11,6) vs 11(5,9-26,2)

#p=0,05 A1c= hemoglobina glicada A1c. Dados apresentados como média ± desvio-padrão ou mediana (intervalo interquartil) conforme distribuição normal ou desviada. Teste t ou Mann-Whitney para comparação entre variáveis contínuas com distribuição normal ou desviada, respectivamente. Teste Qui-quadrado ou Fisher para comparação entre variáveis categóricas nominais.

5 DISCUSSÃO

Diversos estudos foram realizados até o momento com o objetivo de caracterizar o polimorfismo da ECA como fator de risco cardiovascular ou de complicações crônicas do diabetes, tanto em diabéticos tipo 1 (63-70) quanto em pacientes hipertensos, coronariopatas ou portadores de DM2. (54-62)

Em pacientes com DM1, a grande maioria dos estudos foi focada na associação entre polimorfismo da ECA e nefropatia diabética em seus diferentes estágios (63, 64,70) ou níveis pressóricos. (67, 68,69)

A avaliação do polimorfismo C242T do p22phox foi realizada, na maior parte, no contexto da doença cardiovascular. (23, 35-46) Em pacientes portadores de DM2 os principais resultados também são referentes à doença cardiovascular (48,51) ou à presença de nefropatia diabética (47,49,50).

Em diabéticos tipo1, apenas um estudo realizado no Reino Unido avaliou o polimorfismo C242T do p22phox no contexto das complicações microvasculares. (34)

O presente estudo avaliou o polimorfismo C242T do p22phox e I/D da ECA em diabéticos tipo 1 como possível determinante tanto do risco de complicações microvasculares e hipertensão arterial , quanto da presença de fatores de risco cardiovascular. Adicionalmente, foi investigada o efeito da combinação de ambos os polimorfismos na determinação deste risco.

Sabe-se que uma doença complexa é um processo de múltiplos estágios e diferentes fatores genéticos ou ambientais podem influenciar cada estágio de forma diferente. Um determinado polimorfismo pode ter participação na progressão de uma condição patológica para um estágio mais avançado mas não no seu desencadeamento.

O papel do polimorfismo I/D da ECA na progressão da nefropatia diabética em pacientes com DM1 foi estabelecido em alguns estudos (65, 66, 79) mas não em outros (80) e sua participação na iniciação desta complicação ainda é controversa.

De fato, Bouhanick *et al* demonstraram que a presença do genótipo DD da ECA não parece estar associada às alterações precoces na taxa de filtração glomerular que podem

predizer o desenvolvimento de nefropatia diabética em pacientes jovens e com curta duração do diabetes. (81) Já Hadjadj *et al*, em estudo prospectivo, mostraram que a presença do alelo D foi associada a um risco cinco vezes maior de início e progressão da nefropatia diabética. (82) Da mesma forma, em uma coorte de 1365 pacientes com DM1, o genótipo II esteve associado a menor risco para microalbuminúria persistente e nefropatia grave. (83)

Deve-se considerar que poucos pacientes no presente estudo apresentavam complicações avançadas do diabetes (nefropatia clínica e retinopatia proliferativa). Logo, a maioria daqueles incluídos nos grupos de nefropatia e retinopatia apresentava-se no estágio inicial da doença.

Além do estágio da doença, outros fatores poderiam determinar a influência do polimorfismo I/D no desenvolvimento de complicações do diabetes, justificando a divergência entre os resultados. Um destes fatores é o grau de risco da população de DM 1 estudada. Costacou *et al* avaliaram prospectivamente por 10 anos, pacientes com DM1 com idade e duração de doença semelhantes às dos pacientes avaliados no presente estudo e concluíram que nos pacientes de menor risco de complicações crônicas, a presença do alelo D dobrou o risco de nefropatia clínica. (84)

A comparação entre os resultados dos estudos apresenta dificuldades também devido a diferenças nas metodologias empregadas. Alguns estudos avaliam como fator de risco a presença do genótipo DD e outros a presença do alelo D, que inclui os pacientes heterozigotos DI. Alguns avaliam a presença de complicações precoces como microalbuminúria e outros apenas incluem a presença de nefropatia clínica. Na população avaliada neste estudo, nem a presença do genótipo DD nem do alelo D estiveram associadas à presença de nefropatia.

Em concordância com nossos resultados, uma metanálise conduzida por Tarnow *et al*, grande maioria composta por DM1 caucasianos, não mostrou associação entre o polimorfismo I/D da ECA e a presença de nefropatia, também definida como a presença de micro ou macroalbuminúria. (85) Já Barnas *et al* demonstraram que a presença do genótipo DD foi mais freqüente nos portadores de nefropatia, entretanto, o grupo avaliado apresentava maiores idade (46 anos), duração de diabetes (27 anos) e prevalência de retinopatia (64-98%) comparados aos pacientes do presente estudo. (86)

A ausência de associação entre o polimorfismo I/D da ECA e a presença de retinopatia ou hipertensão arterial no estudo realizado está em concordância com outros resultados. Van Ittersum *et al* demonstraram que a avaliação isolada do polimorfismo I/D não mostrou

associação com a presença de nefropatia, retinopatia ou HAS em pacientes com DM1 com maiores idade, duração do diabetes e frequência de hipertensão arterial comparados aos do presente estudo. (87) Entretanto, De Azevedo *et al* demonstraram, em estudo prospectivo brasileiro, que a presença do alelo D foi associada a maior número de casos de HAS e retinopatia comparados aos portadores do genótipo II. (65)

A demonstração experimental de que a angiotensina-2 pode estimular a formação de neovasos retinianos (88) sugere participação do SRA na patogênese da retinopatia em sua forma mais avançada. De fato, no EUCLID, estudo prospectivo realizado em 18 centros europeus que avaliou 530 pacientes com DM1 normotensos, o tratamento com lisinopril resultou em diminuição do risco de progressão da retinopatia independente do seu estágio inicial, mas não de seu surgimento. (89) Uma minoria dos pacientes avaliados no presente estudo apresentava retinopatia proliferativa, o que poderia, em parte, explicar os resultados encontrados.

Estudos com intervenção farmacológica com iECA apontam para um possível papel do SRA na patogênese da resistência insulínica. (90) Entretanto, nos pacientes com DM1 avaliados, o polimorfismo I/D da ECA não foi associado à presença de marcadores indiretos de resistência insulínica como IMC, relação cintura-quadril ou dose diária de insulina.

Pacientes portadores de DM1, comparados a indivíduos não diabéticos, podem apresentar maiores níveis de marcadores de inflamação de baixo grau mesmo na ausência de complicações, conforme demonstrado por Gomes *et al*. (91)

Em concordância, Hayaishi-Okano *et al* demonstraram que os níveis de proteína C-reativa encontravam-se correlacionados à espessura íntima-média carotídea e ambos eram mais elevados em diabéticos tipo 1 do que em controles não diabéticos. (92)

Sugere-se, então, que os níveis de proteína C-reativa podem ser considerados marcadores de doença aterosclerótica precoce no DM1. No presente estudo, os portadores do alelo D apresentaram maiores níveis de proteína C-reativa, no entanto, sem significância estatística após correção para a duração do diabetes. Este fato, porém, não exclui a participação do SRA na patogênese da aterosclerose subclínica. Kretowski *et al* demonstraram que uma combinação de variantes genótípicas do SRA (combinação dos genótipos TT do polimorfismo M235Y do angiotensinogênio, DI da ECA e AA/AC do polimorfismo A 1166C do receptor AT1) determinou a progressão de aterosclerose subclínica avaliada pela calcificação coronariana em DM1 não tratados com iECA. (93)

Os presentes resultados não evidenciaram associação entre o polimorfismo C242T do p22phox (presença do alelo T ou do alelo C) e a presença de nefropatia ou retinopatia diabéticas, HAS ou fatores de risco cardiovascular.

Hodgkinson *et al* evidenciaram que a presença do genótipo TT foi maior em pacientes diabéticos tipo 1 caucasianos com nefropatia clínica comparados àqueles com retinopatia ou sem complicações microvasculares. (34) Estes pacientes apresentavam maiores duração do diabetes (32 anos) e prevalência de nefropatia clínica, tornando difícil a comparação com nossos resultados.

De fato, os resultados dos estudos que avaliaram o polimorfismo C242T do p22phox são bastante controversos, tornando difícil, inclusive, determinar o papel funcional deste polimorfismo. Sabe-se que o sistema NADPH oxidase apresenta importante participação na patogênese da doença vascular no diabetes e que o p22phox é um componente essencial para sua ativação. Entretanto, o polimorfismo C242T apresenta efeitos diversos em diferentes populações, tornando difícil inclusive definir qual alelo determina risco.

A determinação da influência de polimorfismos genéticos na patogênese de doenças crônicas complexas, multifatoriais, como as complicações do diabetes, é sujeita a críticas. Predisposições genéticas podem ser devidas à combinação de vários genes. Além disso, existe um grande número de polimorfismos no genoma humano. Múltiplos genes podem influenciar a expressão da doença, cada um deles com um efeito relativamente fraco e pode ocorrer interação entre eles. Ainda devemos considerar a influência dos fatores ambientais na modulação do efeito genético.

Embora sejam estabelecidos os papéis de ambos SRA e estresse oxidativo na patogênese das complicações do diabetes, no presente estudo, a combinação dos polimorfismos I/D da ECA e C242T do p22phox não determinou risco de complicações ou hipertensão arterial.

A comparação entre resultados de estudos com polimorfismos genéticos apresenta dificuldades especialmente quando avaliamos populações de diferentes etnias e expostas a fatores ambientais diferentes. A população brasileira é composta de grupos geneticamente heterogêneos, o que dificulta a definição de etnia baseada em critérios pouco específicos, muitas vezes subjetivos. Parra *et al* mostraram que a definição de etnia pela ectoscopia na população brasileira é um fraco preditor da ancestralidade genômica africana medida por

marcadores moleculares. (94) No presente estudo não houve diferença na distribuição dos genótipos entre pacientes classificados, pela cor da pele, como brancos ou não brancos.

Na população de diabéticos tipo 1 estudada, a presença do alelo D ou do genótipo DD e dos alelos T ou C do p22phox não foi diferente em relação aos controles não diabéticos, sugerindo que estes polimorfismos não estão associados a risco de DM1. Este fato encontra-se em concordância com os achados de Barkai et al. (95)

O presente estudo apresenta algumas limitações. Primeiramente, a seleção da amostra foi desbalanceada, participando do estudo apenas os pacientes que cumpriram o protocolo de investigação. Mesmo sem haver diferença entre os grupos excluído e incluído, quanto aos parâmetros clínico-demográficos avaliados, não podemos excluir a presença de um viés de seleção.

Além disso, um estudo de corte transversal não possibilita avaliar a influência da exposição contínua a fatores de risco como os controles metabólico e pressórico prévios, no desenvolvimento das complicações. Desta forma os grupos com diferentes genótipos, apesar de não terem diferenças pontuais quanto à presença dos fatores de risco, podem ter apresentado diferenças prévias, tornando-os grupos não homogêneos.

O pequeno número de pacientes portadores de complicações crônicas e controles também conferem limitação ao estudo.

Apesar das limitações descritas na análise de polimorfismos em doenças multifatoriais, a identificação de marcadores genéticos de risco em pacientes portadores de DM1 pode apresentar importância clínica. Sabe-se que o estresse oxidativo é mediador da disfunção endotelial induzida pela hiperglicemia (96), que pacientes expostos a hiperglicemia precocemente desenvolvem uma memória hiperglicêmica também mediada por EROs e que o tratamento intensivo da hiperglicemia diminui o risco de complicações crônicas microvasculares mas não o elimina. Além disso, crianças e adolescentes com DM1 apresentam desenvolvimento precoce de doença aterosclerótica (97) com maior rigidez e espessamento de paredes arteriais antes mesmo da detecção clínica de complicações micro ou macrovasculares. (98,99) Estes fatos tornam importante identificar marcadores de risco mais precoces. Talvez o subgrupo de pacientes de maior risco se beneficie de tratamento antioxidante precoce, antes do estabelecimento da disfunção endotelial. De fato, Ceriello *et al* avaliaram o efeito, a curto prazo, da normoglicemia induzida por insulina, administração de vitamina C e ambas as terapias sobre a função endotelial de pacientes portadores de DM1

normotensos , normoalbuminúricos e sem dislipidemia, com curta duração de diabetes e evidenciaram que o tratamento combinado foi capaz de melhorar a função endotelial mas não os tratamentos isolados. (96) São necessários estudos clínicos bem desenhados para comprovar esta hipótese.

Ainda, é necessário melhor estabelecer em que estágio da evolução do diabetes os fatores genéticos podem influenciar no desenvolvimento de complicações, e quais realmente são os subgrupos de risco. Por exemplo, quando se demonstra que a presença do alelo D determina risco de evolução para nefropatia, estamos selecionando a maioria dos nossos pacientes (portadores do genótipo DD e DI) como subgrupo de risco. Na prática clínica, este dado não oferece boa relação custo-benefício.

6 CONCLUSÕES

Concluimos que, na população de diabéticos tipo 1 estudada, a frequência dos polimorfismos I/D da ECA e C242T do p22phox , isoladamente ou em combinação, não apresentou diferença em pacientes com ou sem complicações microvasculares precoces ou hipertensão arterial. Os níveis dos diferentes marcadores de risco cardiovascular também não apresentaram diferença nos pacientes com os polimorfismos acima descritos. Adicionalmente não houve diferença entre a frequência dos polimorfismos em diabéticos tipo 1 e controles. Estudos prospectivos poderão determinar a possível interação entre estes polimorfismos e a duração do diabetes na expressão clínica das complicações crônicas da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- American Diabetes Association. Diabetes statistics for Youth. <http://www.diabetes.org/utills/printthispage.jsp>, 2004.
- 2- Walsh MG, Zgibor J, Borch-Johnsen K, Orchard TJ, DiaComp investigators. A multinational comparison of complications assessment in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27(7): 1610–1617.
- 3- American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2008; 31:596.
- 4- Mathiesen ER, Ronn B, Storm B, Foght H, Deckert T. The natural course of microalbuminuria in insulin-dependent diabetes: a 10-year prospective study. *Diabet Med*. 1995;12(6): 482 – 7.
- 5-Bidani AK, Griffin KA. Pathophysiology of hypertensive renal damage. Implications for therapy. *Hypertension*. 2004; 44:596-601.
- 6-Monti MC, Lonsdale JT, Montomoli C, Montross R, Schlag E, Greenberg DA. Familial Risk Factors for Microvascular Complications and Differential Male-Female Risk in a Large Cohort of American Families with Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(12): 4650–55.
- 7-Berry C, Brosnan MJ, Fennell J, Hamilton CA, Dominiczak AF. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001; 10(2): 247-55.
- 8- Onozato ML, Tojo A. Role of NADPH oxidase in Hipertension and Diabetic. Nephropathy. *Curr Hypertens Rev*. 2005; 1(1):15-20.
- 9- Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart*. 2004; 90: 491-3.
- 10- Cross AR, Jones OTG. Enzymatic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 1057: 281-98.
- 11- Goligorsky MS. Making sense out of oxygen sensor. *Circ Res*. 2000; 86(8):824-26.

- 12- Geiszt M, Zopp JB, Vamai P. Identification of renox, an NADPH oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(14): 8010-14.
- 13-Heerebeek LV, Meischl C, Stooker W, Meijer CJLM, Niessen HWM, Roos D. NADPH oxidase: new source of reactive oxygen species in the vascular system? *J Clin Pathol*. 2002; 55: 561-68.
- 14- Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 285: R277-97.
- 15- Bayraktutan U, Draper N, Lang D, Shah AM. Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 1998; 38(1):256-62.
- 16- Bayraktutan U, Blayney L, Shah AM. Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91phox and p22phox in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(8):1903-11.
- 17- Fukui T, Lassegue B, Kai H, Alexander RW, Griendling KK. Cytochrome b558 alpha subunit cloning and expression in rat aortic smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1231(3):215-19.
- 18- Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1996; 271(38): 23317-21.
- 19- Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T, Welch WJ, Wilcox CS. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension*. 2002; 39(2): 269-74.
- 20- Azumi H, Inoue N, Takeshita S, Rikitake Y, Kawashima S, Hayashi Y, et al. Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation*. 1999; 100(14):1494-8.
- 21 - Greiber S, Münzel T, Kästner S, Müller B, Schollmeyer P, Pavenstädt H. NAD(P)H oxidase activity in cultured human podocytes: effects of adenosine triphosphate. *Kidney Int*. 1998; 53(3): 654-63.
- 22- Jones SA, Hancock JT, Jones OT, Neubauer A, Topley N. The expression of NADPH oxidase components in human glomerular mesangial cells: detection of protein and mRNA for p47 phox, p67phox and p22phox. *J Am Soc Nephrol*. 1995; 5(7): 1483-91.
- 23- Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K, Yamada S, Akita H, Yokoyama M. Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22phox gene in Patients with Coronary Artery Disease. *Circulation*. 1998; 97:135-7.

- 24- The Diabetes Control and Complications Trial/ Epidemiology of diabetes interventions and complications research group. *N Engl J Med.* 2003; 348: 2294- 303.
- 25- Ihnat MA, Thorpe JE, Kamat CD, Szabó C, Green DE, Warnke LA, et al. Reactive oxygen species mediate a cellular ‘memory’ of high glucose stress signaling. *Diabetologia.* 2007; 50(7):1523-31.
- 26- Channon KM, Guzik TJ. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: Relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol.* 2002; 53 (4): 515-24.
- 27- Ballinger SW, Patterson C , Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, et al. Hydrogen peroxide and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res.* 2000; 86: 960-6.
- 28- Ceriello A, Morocutti A, Mercuri F, Quagliaro L, Moro M, Damante G, Viberti GC. Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes.* 2000, 49 (12): 2170-77.
- 29- Marra G, Cotroneo P, Pitocco D, Manto A, Di Leo MAS, Ruotolo V, et al. Early increase of oxidative stress and reduced antioxidant defenses in patients with uncomplicated type 1 diabetes. A case for gender difference. *Diabetes Care.* 2002; 25(2): 370-5.
- 30- Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM. The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2005; 16 (3):120-6.
- 31- Zhao W, Ahokas RA, Weber KT, Sun Y. ANG II-induced cardiac molecular and cellular events: role of aldosterone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291: H336-H343.
- 32- Osei SY, Price DA, Fisher NDL, Porter L, Laffel LMB, Hollenberg NK. Hyperglycemia and angiotensin-mediated control of the renal circulation in healthy humans. *Hypertension.* 1999; 33(1PT2): 559-64.
- 33- Cooper ME. Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet.* 1998; 352(9123): 213-9.
- 34- Hodgkinson AD, Millward BA, Demaine AG. Association of the p22phox component of NADPH oxidase with susceptibility to diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2003; 26(11): 3111-5.
- 35- Cai H, Duarte N, Wilcken DEL, Wang XL, Li Wang X. NADH/NADPH oxidase p22phox C242T polymorphism and coronary artery disease in the Australian population. *Eur J Clin Invest.* 1999; 29(9): 744-8.

- 36- Nasti S, Spallarossa P, Altieri P, Garibaldi S, Fabbi P, Polito L, et al. C242T polymorphism in CYBA gene (p22phox) and risk of coronary artery disease in a population of Caucasian Italians. *Dis Markers*. 2006; 22(3) 167-73.
- 37- Drummond RS, Brosnan MJ, Lee WK, Kirk A, Pathi V, Hamilton CA, et al. A single nucleotide polymorphism in the p22phox gene affects arterial compliance. *Endocrine Abstracts*. 2003; 5: OC 14.
- 38- Guzik TJ, West NEJ, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Functional Effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation*. 2000; 102: 1744-7.
- 39- Fan M, Kähönen M, Rontu R, Lehtinen R, Viik J, Niemi M, et al. The p22phox C242T gene polymorphism is associated with a reduced risk of angiographically verified coronary artery disease in a high-risk Finnish Caucasian population. The Finnish Cardiovascular Study. *Am Heart J*. 2006; 152(3): 538-42.
- 40- Kuroda J, Kitazono T, Ago T, Ninomiya T, Ooboshi H, Kamouchi M, et al. NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and ischemic stroke in Japan: The Fukuoka Stroke Registry and the Hisayama study. *Eur J Neurol*. 2007;14 (10): 1091-7.
- 41- Moreno M, Gorra SJ, Fortuno A, Beloqui O, Diez J, Zalba G. The C242T CYBA polymorphism of NADPH oxidase is associated with essential hypertension. *J Hypertens*. 2006; 24(7): 1299-1306.
- 42- Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. NADH/NADPH oxidase p22 phox gene polymorphism is associated with improved coronary endothelial vasodilator function. *Eur Heart J*. 2001, 22(1): 96-101.
- 43- Zafari AM, Davidoff MN, Austin H, Valppu L, Cotsonis G, Lassegue B, et al. The A640G and C242T p22phox polymorphisms in patients with coronary artery disease. *Antioxid Redox Signal*. 2002; 4(4): 675-80.
- 44- Li A, Prasad A, Mincemoyer R, Satorius C, Epstein N, Finkel T, et al. Relationship of the C242T p22phox polymorphism to angiographic coronary artery disease and endothelial function. *Am J Med Genet*. 1999; 86(1): 57-61.
- 45- Gardemann A, Mages P, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. The p22phox A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. *Atherosclerosis*. 1999; 145(2): 315-23.
- 46- Castejon AM, Bracero J, Hoffmann IS, Alfieri AB, Cubeddu LX. NAD(P)H oxidase p22phox gene C242T polymorphism, nitric oxide production, salt sensitivity and cardiovascular risk factors in Hispanics. *J Human Hypertens*. 2006; 20: 772-779.

- 47- Matsunaga-Irie S, Maruyama T, Yamamoto Y, Motohashi Y, Hirose H, Shimada A, et al. Relation between development of nephropathy and the p22 phox C242T and receptor for advanced glycation end product G1704T gene polymorphism in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2004; 27(2): 303-307.
- 48- Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Sakamoto K, Ohtoshi K, Katakami N, et al. Association of NADPH oxidase p22 phox gene variation with advanced carotid atherosclerosis in Japanese type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003; 26(2): 458-463.
- 49- Santos KG, Canani LH, Gross JL, Tschiedel B, Souto KE, Roisenberg I. Relationship of p22phox C242T polymorphism with nephropathy in type 2 diabetic patients. *J Nephrol*. 2005; 18(6): 733-8.
- 50- Lim SC, Goh SK, Lai YR, Tee WW, Hoh A, Xu XH, et al. Relationship between common functional polymorphisms of the p22 phox gene (-930A>G and +242C>T) and nephropathy as a result of type 2 diabetes in a Chinese population. *Diabet Med*. 2006; 23(9):1037-41.
- 51- Soccio M, Pandolfi A, Di Castelnuovo A, Carluccio M, Ciccarone E, Toniato E, et al. NADPH oxidase C242T gene variations and cardiovascular protection. *J Thromb Haemost*. 2003; 11 (Suppl):12-8.
- 52- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. 1990; 86(4): 1343-6.
- 53- Tiret L, Visvikis BRS, Breda C, Corvolt P, Cambien F, Soubrier F. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet*. 1992; 51(1):197-205.
- 54- Fernández-Llama P, Poch E, Oriola J, Botey A, Coll E, Darnell A, et al. Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism in essential hypertension and nephroangiosclerosis. *Kidney Int*. 1998; 53(6):1743-7.
- 55- Dell'omo G, Penno G, Pucci L, Lucchesi D, Fontino C, Del Prato S, et al. ACE gene insertion/deletion polymorphism modulates capillary permeability in hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 2006; 111(6):357-64.
- 56- Basar Y, Salmayenli N, Aksoy M, Seckin S, Aydin M, Ozkok E. ACE gene polymorphism in peripheral vascular disease. *Horm Metab Res*. 2007; 39(7): 534-7.
- 57- Ludwig E, Corneli PS, Anderson JL, Marshall HW, Lalouel JM, Ward RH. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction but not with development of coronary stenosis. *Circulation*. 1995; 91(8):2120-4.
- 58- Kahonen M, Lehtimaki T, Laaksonen R, Janatuinen T, Vesalainen R, Laine H, et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and coronary reactivity in young men. *Scand J Clin Lab Invest*. 2007; 67(6):596-603.

- 59- Moleda P, Majkowska L, Safranow K, Adler G, Goracy I, Pilarska K. I/D polymorphism of angiotensin I converting enzyme gene and insulin resistance and some parameters of metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes. *Pol Arch Med Wewn.* 2005; 114(6):1172-9.
- 60- Moleda P, Majkowska L, Safranow K, Adler G, Goracy I. I/D polymorphism of angiotensin I converting enzyme gene and arterial hypertension in patients with type 2 diabetes. *Pol Merkur Lekarski.* 2007; 22(129): 169-72.
- 61- Canani LH, Costa LA, Crispim D, Santos K, Roisenberg I, Lisbôa HRK, et al. The presence of allele D of angiotensin-converting enzyme polymorphism is associated with diabetic nephropathy in patients with less than 10 years duration of Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine* 2005; 22(9): 1167–1172.
- 62- Huang XH, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Hiltunen TP, Koivula T, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and diabetic albuminuria in patients with NIDDM followed up for 9 years. *Nephron.* 1998; 80(1):17-24.
- 63- Weekers L, Bouhanick B, Hadjadj S, Gallois Y, Roussel R, Pean F, et al. Modulation of the renal response to ace inhibition by ace insertion/deletion polymorphism during hyperglycemia in normotensive, normoalbuminuric type 1 diabetic patients. *Diabetes.* 2005; 54(10): 2961-7.
- 64- Jacobsen P, Rossing P, Tarnow L, Mallet C, Poirier O, Cambien F, Parving HH. Angiotensin converting enzyme polymorphism and ACE inhibition in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 1998; 53 (4):1002-6.
- 65- de Azevedo MJ, Dalmáz CA, Caramori ML, Pecis M, Esteves JF, Maia AL, Gross JL. ACE and PC-1 gene polymorphisms in normoalbuminuric type 1 diabetic patients: a 10-year prospective study. *J Diabetes Complicat.* 2002; 16(4):255-62.
- 66- De Cosmo S, Miscio G, Zucaro L, Margaglione M, Argiolas A, Thomas S, et al. The role of PC-1 and ACE genes in diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients: evidence for a polygenic control of kidney disease progression. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17(8):1402-7.
- 67- Barkai L, Soós A, Vámosi I. Association of angiotensin-converting enzyme DD genotype with 24-h blood pressure abnormalities in normoalbuminuric children and adolescents with Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2005; 22(8):1054-9.
- 68- Szadkowska A, Pietrzak I, Klich I, Mlynarski W, Bodalska-Lipinska J, Bodalski J. Polymorphism I/D of angiotensin-converting enzyme gene and disturbance of blood pressure in type 1 diabetic children and adolescents. *Przeql Lek.* 2006; 63 (Suppl 3):32-6.
- 69- Luik PT, Hoogenberg K, Kerstens MN, Beusekamp BJ, De Jong PE, Dullaart RP, et al. The influence of the ACE (I/D) polymorphism on systemic and renal vascular responses to

angiotensins in normotensive, normoalbuminuric Type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2003; 46(8):1131-9.

70- Vleming LJ, Van der Pijl JW, Lemkes HH, Westendorp RG, Maassen JA, Daha MR, et al. The DD genotype of the ACE gene polymorphism is associated with progression of diabetic nephropathy to end stage renal failure in IDDM. *Clin Nephrol*. 1999; 51(3):133-40.

71- Catar RA, Müller G, Heidler J, Schmitz G, Bornstein SR, Morawietz H. Low-density lipoproteins induce the renin-angiotensin system and their receptors in human endothelial cells. *Horm Metab Res*. 2007; 39 (11): 801-805.

72- Penno G, Chaturvedi N, Talmud PJ, Cotroneo P, Manto A, Nannipieri M, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism on progression of renal disease and the influence of ACE inhibition in IDDM patients. Findings from the EUCLID randomized controlled trial. *Diabetes*. 1998; 47(9):1507-1.

73- JNC 7. The seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. U.S. Department of Health and Human Services. National Institute of Health. National Heart, Lung and Blood Institute. NIH Publication No 03-5233 December 2003.

74- The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics*. 2004; 114: 555-75.

75- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972; 14:499-502.

76-Gault MH, Longerich LL, Harnett JD, Wesolowski C: Predicting glomerular function from adjusted serum creatinine. *Nephron*. 1992; 62(3):249-56.

77- Schwartz GJ, Feld LG, Langford DJ: A simple estimate of glomerular filtration rate in full-term infants during the first year of life. *J Pediatr*. 1984; 104 (6):849-54.

78- Bhaskar S, Reddy DN, Mahurkar S, Rao GV, Singh L, Chandak GR. Lack of significant association of an insertion/deletion polymorphism in the angiotensin converting enzyme (ACE) gene with tropical calcific pancreatitis. *BMC Gastroenterology*. 2006;6:42. Published online doi: 10.1186/1471-230X-6-42.

79- Rudberg S, Rasmussen LM, Bangstad HJ, 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*. 2000; 23(4): 544-8.

80- Björck S, Blohmé G, Sylvén C, Mulee H. Deletion insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12(suppl 2): 67-70.

- 81- Bouhanick B, Gallois Y, Hadjadj S, Casson FB, Limal JM, Marre M. Relationship between glomerular hyperfiltration and ACE insertion/deletion polymorphism in type 1 diabetic children and adolescents. *Diabetes Care*. 1999; 22(4): 618-22.
- 82- Hadjadj S, Belloum R, Bouhanick B, Gallois Y, Guilloteau G, Chatellier G, et al. Prognostic value of angiotensin-I converting enzyme I/D polymorphism for nephropathy in type 1 diabetes mellitus: a prospective study. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12(3): 541-9.
- 83-Boright AP, Paterson AD, Mirea L, Bull SB, Mowjoodi A, Scherer SW, et al. Genetic variation at the ACE gene is associated with persistent microalbuminuria and severe nephropathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC genetics study. *Diabetes*. 2005; 54(4):1238-44.
- 84- Costacou T, Chang Y, Ferrell RE, Orchard TJ. Identifying genetic susceptibilities to diabetes-related complications among individuals at low risk of complications: an application of tree-structured survival analysis. *Am J Epidemiol*. 2006; 164(9): 862-72.
- 85- Tarnow L, Glud C , Parving H-H. Diabetic nephropathy and the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13: 1125–30.
- 86- Barnas U , Schmidt A , Illievich A , Kiener H P, Rabensteiner D , Kaider A , et al. 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*. 1997; 40(3): 327-31.
- 87-Van Ittersum FJ, de Man AM, Thijssen S, de Knijff P, Slagboom E, Smulders Y, et al. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and complications of insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15(7): 1000-7.
- 88-Otani A, Takagi H, Suzuma K, Honda Y. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. *Circ Res*. 1998; 82(5): 619–28.
- 89-The EUCLID Study Group. Randomised placebocontrolled trial of lisinopril in normotensive patients with insulin-dependent diabetes and normoalbuminuria or microalbuminuria. *Lancet*. 1997; 349(9068): 1787–92.
- 90- Scheen AJ. Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the renin-angiotensin system. *Drugs*. 2004; 64(22):2537-65.
- 91-Gomes MB, Piccirillo LJ, Nogueira VG, Matos HJ. Acute-phase proteins among patients with type 1 diabetes. *Diabetes Metab*. 2003; 29(4): 405-11.

- 92- Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Katakami N, Ohtoshi K, Gorogawa S, Kuroda A, et al. Elevated C-reactive protein associates with early-stage carotid atherosclerosis in young subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2002; 25(8): 1432-8.
- 93- Kretowski A, McFann K, Hokanson JE, Maahs D, Kinney G, Snell-Bergeon JK, et al. Polymorphisms of the renin-angiotensin system genes predict progression of subclinical coronary atherosclerosis. *Diabetes*. 2007; 56(3):863-71.
- 94-Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(1):177-82.
- 95-Barkai L, Soós A, Vámosi I. Association of angiotensin-converting enzyme DD genotype with 24-h blood pressure abnormalities in normoalbuminuric children and adolescents with Type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2005; 22(8):1054-9.
- 96-Ceriello A, Kumar S, Piconi L, Espósito K, Giugliano D. Simultaneous control of hyperglycemia and oxidative stress normalizes endothelial function in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2007; 30(3):649–54.
- 97- Dahl-Jorgensen K, Larsen JR, Hanssen KF. Atherosclerosis in childhood and adolescent type 1 diabetes: early disease, early treatment? *Diabetologia*. 2005; 48(8):1445-53.
- 98-Rönnback M, Fagerudd J, Forsblom C, Pettersson-Fernholm K, Reunanen A, Per-Henrik Groop and on behalf of the Finnish Diabetic Nephropathy. Altered age-related blood pressure pattern in type 1 diabetes. *Circulation*. 2004; 110(9):1076-82.
- 99-Giannattasio C, Failla M, Piperno A, Grappiolo A, Gamba P, Paleari F, et al. Early impairment of large artery structure and function in type I diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1999; 42(8): 987-94.

ANEXO A

ACE I/D and C242T p22phox polymorphisms, alone or in combination, are not associated with microvascular complications or arterial hypertension in type 1 diabetic patients

Abstract

Background and aims: Genetic factors may lead to a higher individual susceptibility to diabetic complications and the C242T polymorphism of p22phox, an essential component for activation of NADPH oxidase and the I/D polymorphism of the angiotensin converting enzyme (ACE) may contribute to this risk. The aim of this study was to investigate the association between both polymorphisms, alone or in combination, and diabetic microvascular complications (nephropathy and retinopathy) and arterial hypertension in patients with type 1 diabetes (T1DM).

Methods: A cross-sectional study was conducted in 103 patients with T1DM, aged 28.8 ± 10.6 years and with a 13.1 ± 8.5 years disease duration. DNA was isolated from lymphocytes and ACE I/D and p22phox C242T genotype analysis were performed. Patients were screened for diabetic nephropathy (microalbuminuria or macroalbuminuria) and retinopathy (non-proliferative or proliferative) and underwent clinical and laboratory evaluation. Hypertension was defined as blood pressure $\geq 140 \times 90$ mmHg or the use of anti-hypertensive drugs.

Results: Of the 103 patients studied, 23(22.3%) and 5 (4.9%) had micro and macroalbuminuria, respectively; 21(20.4%) and 4(3.9%) had non-proliferative and proliferative retinopathy, respectively, and 19 (18.4%) were hypertensive. ACE I/D and p22phox C242T polymorphisms were not associated with the presence of diabetic nephropathy, retinopathy or hypertension. Patients carrying the D allele showed higher levels of diastolic blood pressure (72.2 ± 12.3 vs 65.4 ± 11.6 mmHg, $p = 0.047$) but this analysis lost statistical significance after correction for diabetes duration. The combination of ACE and p22phox polymorphisms was not associated with diabetic complications or hypertension.

Conclusions: In the studied population of type 1 diabetic patients, the frequency of ACE I/D and C242T of p22phox polymorphisms, alone or in combination, was not different in patients with or without early microvascular complications or hypertension. However, prospective studies may determine the possible interaction between these polymorphisms and duration of diabetes in the clinical expression of chronic complications of diabetes.

Keywords: Angiotensin converting enzyme, chronic complications, genetic polymorphism, NADPH oxidase oxidative stress, type 1 diabetes.

INTRODUCTION

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is a chronic disease, currently considered the most common endocrine disease in childhood and adolescence (1) Patients with T1DM have a substantial risk of chronic complications (2), resulting in poor quality of life and reduced life expectancy for the patient and high health-care costs. Around 50% of the total costs related to diabetes are due to complications of the disease. (3)

The classic risk factors for the development of chronic complications of diabetes include glycemic control, hypertension and dyslipidemia. (4) However, there is an individual susceptibility to the development of complications and genetic factors have been studied as possible contributors. Indeed, the pathophysiology of complex diseases such as diabetic nephropathy and retinopathy and hypertension involves a genetic susceptibility associated with the influence of environmental factors.

Oxidative stress and endothelial dysfunction are early events in the development of complications both in micro and macrovasculature and could be considered the common denominator by which hyperglycemia, hypertension and dyslipidemia act.

The NADPH oxidase enzyme was originally described in phagocytes, but many of its subunits were identified in animals and humans tissues. (5) The p22phox component of NADPHoxidase forms the α subunit of cytochrome b558 and is closely associated and stabilizes subunit Nox-2. It also participates in the binding of cytoplasmic subunits p47 and p67 phox resulting in the activation of the enzyme.

The renin-angiotensin system (RAS) is an enzymatic cascade involved in the pathophysiology of diabetic complications. Angiotensin-2, through its action on AT1 receptors, is primarily responsible for the effects of the RAS on tissue damage induced by diabetes.

ACE I / D polymorphism accounts for 50% of the phenotypic variability of the enzyme. (6) The fragment of 286 base pairs inserted in intron 16 of the gene encoding ACE, which characterizes the I allele, appears to negatively regulate gene expression. Therefore, individuals carrying the DD genotype have serum ACE activity about two times higher than those with genotype II. (6, 7) Also, there is evidence that the RAS is highly active during hyperglycemia in the renal circulation of T1 DM and these renal hemodynamic changes are more intense in patients that carry the D allele (8).

Previous studies demonstrated that the presence of the T allele of C242T p22phox polymorphism was associated with decreased activity of NADPH oxidase in human veins in patients with coronary artery disease (CAD) (9) Also, patients with the CC genotype had higher NADPH oxidase activity in phagocytes. (10) Clinical studies evaluated the C242T p22phox polymorphism as a cardiovascular risk factor (11, 12, 13, 14) or a determinant of diabetic complications. (15, 16, 17, 18, 19) showing conflicting results. Hodgkinson et al showed that in patients with T1DM, the presence of the TT genotype was more frequent in those with diabetic nephropathy compared with those with retinopathy alone or without microvascular complications. (20)

Since both RAS and oxidative stress mediated by NADPH oxidase play an important role in the vascular damage in diabetes, the interaction between both ACE I/D and C242T p22phox polymorphisms could be a genetic risk marker of microvascular complications and arterial hypertension in patients with T1DM.

The aim of this cross-sectional study was to investigate the association between ACEI/D and p22phox C242T polymorphisms, alone and in combination, and the presence of diabetic microvascular complications (nephropathy and retinopathy) and arterial hypertension in patients with T1DM.

METHODS

Study Population

The diabetic population was composed of outpatients with diabetes type 1 who regularly attended the diabetes clinic at University Hospital Pedro Ernesto, a tertiary referral hospital of State University of Rio de Janeiro, Brazil. The inclusion criteria were diagnosis of T1DM, regular follow up at our clinic and agreement to participate by means of informed consent. Diagnosis of Type 1 diabetes was defined according to the criteria of the American Diabetes Association and the Brazilian Society of Diabetes for patients under 40 years old at diagnosis, history of diabetic ketoacidosis or ketonemia, insulin use not interrupted since the diagnosis. The observational design was approved by the local Ethics Committee.

Clinical and laboratory evaluations

Patient's clinical and demographic data of interest included sex, age (years), age at diagnosis (years), duration of diabetes (years), presence of current or prior smoking, family history of type 2 diabetes (T2DM) in first-degree relatives and daily insulin dose.

Blood pressure was measured three times after 15 minutes at rest in supine position by the same observer using a standard mercury sphygmomanometer. Diastolic blood pressure (dBp) was recorded at the disappearance of Korotkoff sounds (phase 5). The mean of these measures systolic and diastolic was calculated. Based on JNC VII (21) criteria, adults were classified as hypertensive if sBP ≥ 140 mmHg and / or dBp ≥ 90 mmHg, when the abnormal measurements repeated in two or more consultations. For adolescents the table of percentile for gender, age and height was used to classify as hypertensive if BP $\geq p95$, measured in at least three different occasions. (22) Weight and height were measured to the nearest 0.1 Kg and 0.1 cm respectively. Body mass index (BMI-Kg/m²) was calculated.

One ophthalmologist examined all the retinas by fundoscopy through dilated pupils by slit lamp stereoscopic biomicroscopy, and the patients were classified into two groups depending on the presence or absence of nonproliferative or proliferative retinopathy. The most seriously affected eye was used in the evaluation.

All participants provided three accurately timed overnight urine samples over six months with at least one week of interval between collections and were instructed to collect urine under their usual

conditions, avoiding intensive physical activity. Urine was collected into containers without a preservative. The urinary volume was recorded and aliquots stored in glass tubes at -20°C until analysis (within 2 months). Urinary albumin concentration was estimated by solid-phase competitive chemiluminescent enzyme immunoassay (Immulite 1000 Systems, DPC Medlab, Los Angeles, CA, sensitivity of $0.9\ \mu\text{g/ml}$) with an intra-assay and inter-assay coefficient of variation of 2.4% and 5.7 %, respectively. Patients with all values of albumin excretion rate (AER) $< 20\ \mu\text{g/min}$ were classified as normoalbuminuric. Microalbuminuria was defined as $\text{AER} \geq 20$ and $< 200\ \mu\text{g/min}$ in at least two out of three overnight urine specimens. Nephropathy was defined as the presence of microalbuminuria or macroalbuminuria or $\text{GFR} < 60\text{ml/min}$.

Each urine specimen was tested for urinary infection and when bacteriuria was more than $100.000/\text{mm}^3$ the urine was discarded and a new sample was collected after treatment. Normal serum creatinine ($0.8 - 1.4\ \text{mg/dl}$) and normal urinary sediments (absence of proteins, red blood cells, hemoglobin, white blood cells, nitrites, casts) were used to exclude primary renal disease.

Fasting blood samples were obtained on the same day of overnight urine delivery. All patients had their usual insulin dose after fasting blood collection. Blood collection two hours after patients' usual breakfast was obtained for postprandial glycemia.

Triglycerides, total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, fasting plasma glucose (FPG) and plasma creatinine were measured by an enzymatic procedure using an auto analyzer (Cobas - Mira Roche). Low density lipoprotein (LDL) cholesterol was calculated by the Friedewald method (23). Glycated hemoglobin (A1c) was determined by HPLC (Hitachi L-9100) with reference range from 2.6 to 6.2%.

In patients younger and older than 16 years of age, the glomerular filtration rate (GFR) was estimated by the Schwartz's (24) and Cockcroft and Gault equations, respectively. (25).

DNA Extraction

The DNA was isolated from lymphocytes using standard extraction technique of GFX Genomic Blood DNA Purification Kit from Amersham Biosciences.

Determination of C/T polymorphism of p22phox component of NADPH oxidase

The CC, CT and TT genotypes of p22phox were determined by PCR (Polymerase Chain Reaction) using a specific primer followed by enzymatic restriction with RSA-1 specific to the C242T sequence. The amplified material is digested and assessed by gel-electrophoresis (agarose), photographed on Polaroid film for data storage. The protocol is described elsewhere (26).

Determination of I/D ACE polymorphism

The II, ID and DD genotypes were determined by PCR (Polymerase Chain Reaction) using a specific primer. (27)

Statistical methods

Analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 13.0. Numeric values are expressed as median (interquartile range) and categorical variables as count (percentage). The Hardy-Weinberg equilibrium was checked using chi-square test. Association between the allelic distribution and genotypes and presence of retinopathy, nephropathy and hypertension was analyzed using chi-square test or Fisher test if appropriate. Student t test or nonparametric Mann-Whitney was used for comparison of genotypes in relation to clinical and laboratory data if normal or skewed distribution was observed, respectively. A tailed-value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Of the 103 diabetic patients studied, 23 (22.3%) and 5 (4.9%) showed microalbuminuria and macroalbuminuria, respectively; 19 (18.4%) were classified as hypertensive, and 21(20.4%) and 4(3.9%) had nonproliferative and proliferative retinopathy, respectively. The ACE genotype distributions in patients were II 14.6%, DI 52.4%, DD 33%; and allele frequencies, 0.408 for allele I and 0.592 for allele D. The p22phox genotype distributions were TT 8.7%, CT 53.4%, CC 37.9% and the allele frequencies, 0.354 for allele T and 0.646 for allele C. Both distribution were in Hardy-Weinberg equilibrium ($X^2=0.78$, $p=0.686$ for ACE polymorphism and $X^2=2.87$, $p=0.238$ for p22phox polymorphism).

Clinical and demographic data were not different according to genotype distributions.(table 1)

Diastolic blood pressure was higher in D allele carriers (72.2 ± 12.3 vs 65.4 ± 11.6 mmHg, $p = 0.047$), but it lost statistic significance after correction for duration of diabetes($p = 0.14$). Also, laboratory data did not differ according to genotype distributions (table 2).

The presence of ACE I or D alleles and p22phox C or T alleles was not associated with diabetic nephropathy, retinopathy or hypertension (Table 3).

As shown in the isolated analysis, there was no statistically significant difference between the presence of combination of ACE and p22phox polymorphisms and the presence of nephropathy, retinopathy or hypertension. (table 4)

DISCUSSION

A complex disease is a multistage process, and different genetic or environmental factors may influence each stage. A particular polymorphism may play a role in the progression of complication to a more advanced stage but not in its onset. The role of ACE I / D polymorphism in the progression of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes has been established in some studies (28, 29, 30) but not in others (31) and its participation in the onset of this complication remains controversial.

In fact, Bouhanick et al demonstrated that the presence of ACE DD genotype does not appear to be associated with the early changes in GFR that can predict the development of diabetic nephropathy in young patients with short duration of diabetes. (32) In contrast, Hadjadj et al, in a prospective study, showed that the presence of D allele was associated with a five time greater risk of onset and progression of diabetic nephropathy. (33) In a cohort of 1,365 patients with type 1 diabetes, the II genotype was associated with lower risk for persistent microalbuminuria and severe nephropathy. (34)

Few patients in this study showed advanced complications of diabetes (clinical nephropathy and proliferative retinopathy). Therefore, most patients in the nephropathy and retinopathy group showed these complications in the initial stage of the disease.

Besides the stage of the disease, other factors may determine the influence of I / D polymorphism in the development of diabetes complications, which might explain the difference between the results. One of these factors is the degree of risk of the studied population. Costacou et al prospectively evaluated patients with type 1 diabetes for 10 years, whose age and disease duration were similar to those of our patients, and concluded that in patients at lower risk of chronic complications the presence of D allele doubled the risk of clinical nephropathy. (35)

Comparison of the results of the studies also presents difficulties due to the differences in the methods used. According to some studies, the presence of DD genotype was a risk factor, while for others, the presence of allele D, which includes heterozygous DI patients, was a risk factor. Some studies assessed the presence of early complications of diabetes such as microalbuminuria, whereas others focused on the presence of clinical nephropathy. In our study, neither the presence of genotype DD nor D allele was associated with nephropathy.

Accordingly, a meta-analysis conducted by Tarnow et al, most composed of Caucasian with type 1 diabetes showed no association between the I / D polymorphism of ACE and nephropathy, also defined as the presence of micro or macroalbuminuria. (36) Barnas et al demonstrated that the presence of DD genotype was more frequent in patients with nephropathy. However, these patients were older (46 years old), had diabetes for a longer period (27 years) and greater prevalence of retinopathy (64-98 %) compared to our patients.(37)

The lack of association between the ACE I / D polymorphism and the presence of retinopathy or hypertension in our study are in agreement with other results. Van Ittersum et al demonstrated that the evaluation of I / D polymorphism alone was not associated with the presence of nephropathy, retinopathy or hypertension in older patients with type 1 diabetes, longer diabetes duration and greater frequency of hypertension compared to ours. (27) However, in a prospective study in Brazil, De Azevedo et al demonstrated that the presence of D allele was associated with a higher number of cases of hypertension and retinopathy compared with those carrying the II genotype. (28)

The experimental demonstration that Angiotensin-2 can stimulate the formation of retinal neovascularization (38) suggests involvement of the RAS in the pathogenesis of retinopathy in its most advanced stage. In fact, in EUCLID, a prospective study conducted in 18 European centers that

evaluated 530 normotensive patients with type 1 diabetes, treatment with lisinopril resulted in decreased risk of progression of retinopathy regardless the stage, but not of its onset. (39) A small percentage of the patients evaluated in our study had proliferative retinopathy, which might partly explain our results. We found no association between the C242T polymorphism of p22phox (allele T or C) and the presence of nephropathy, retinopathy, hypertension or cardiovascular risk factors. Hodgkinson et al reported that the presence of the TT genotype was greater in Caucasian type 1 diabetic patients with clinical nephropathy compared to those with retinopathy or without microvascular complications. (20) Since these patients had longer duration of diabetes (32 years) and greater prevalence of clinical nephropathy, it was difficult to perform a comparison with our results.

In fact, the results of the studies on C242T polymorphism of p22phox are quite controversial, making it difficult to even determine the functional role of this polymorphism. It is known that the NADPH oxidase system has an important role in the pathogenesis of vascular disease in diabetes and that p22phox is an essential component for their activation. However, the C242T polymorphism has different effects on different populations, which makes it difficult to even define which one is the risk allele.

The determination of the influence of genetic polymorphisms in the pathogenesis of complex and multifactorial diseases such as chronic complications of diabetes is subject to criticism. Genetic predispositions may be due to a combination of several genes. Also, there is a large number of polymorphisms in the human genome. Multiple genes can influence the expression of the disease, each one having a relatively weak effect, and interaction may occur between them. Yet, we must consider the influence of environmental factors in the modulation of genetic effects.

Although the roles of both RAS and oxidative stress are established in the pathogenesis of diabetes complications, in our study, the combination of ACE I / D and C242T polymorphisms did not determine the risk of microvascular complications or hypertension.

The present study has some limitations. The evaluation of the influence of continuous exposure to risk factors such as blood pressure and metabolic control prior to the development of complications cannot be assessed in a cross-sectional study. So, despite the fact that no differences were found between the groups with different genotypes regarding the presence of risk factors, some differences might have been apparent prior to this evaluation.

Despite the limitations outlined in the analysis of polymorphisms in multifactorial diseases, the identification of genetic risk markers in patients with type 1 diabetes may have clinical importance. It is known that oxidative stress mediates endothelial dysfunction induced by hyperglycemia (40), and that patients exposed early to hyperglycemia develop a hyperglycemic memory also mediated by ROS and, also, that intensive treatment of hyperglycemia can reduce, though not eliminate, the risk of chronic microvascular complications. Furthermore, children and adolescents with type 1 diabetes have early development of atherosclerosis (41) with increased arterial stiffness and thickening prior to clinical detection of micro and macrovascular complications. (42,43) Therefore, early identification of risk

markers is of utmost importance. The subgroup of patients at higher risk might possibly benefit from early treatment with antioxidant before the establishment of endothelial dysfunction. In fact, Ceriello et al evaluated the short term effect of normoglycemia induced by insulin administration, vitamin C and both therapies on endothelial function in normotensive, normoalbuminuric patients with T1DM, with short duration of diabetes, with and without dyslipidemia, and found that only the combined treatment was able to improve endothelial function. (40) Further well-designed clinical studies are required to prove this hypothesis.

Still, it is necessary to better establish at what stage of diabetes genetic factors may influence the development of complications and also establish the subgroups of patients that are at real risk. For example, considering that the presence of D allele determines risk of progression to nephropathy, most patients in our study (patients with genotype DD or DI) were selected as a subgroup at risk. In clinical practice, this data does not provide a very cost-effective relationship.

We concluded that in the assessed population of type 1 diabetic patients, the frequency of ACE I / D and p22phox C242T polymorphisms, alone or in combination, was not different in patients with or without early microvascular complications or hypertension. Also, the levels of different markers of cardiovascular risk did not differ in patients with the polymorphisms described above. Prospective studies may determine the possible interaction between these polymorphisms and duration of diabetes in the clinical expression of chronic complications of the disease.

Table1- Clinical and demographic data from patients with T1DM according to the presence of ACE I and D alleles and p22phox C and T alleles.

Genotypes	ACE		P22phox	
	DD vs II/DI	II vs DD/DI	CC vs CT/TT	TT vs CT/CC
Age (years)	30 (23.5-36.3) vs 26(20-36)	22(19-33) vs 28(21-37)	26(19-35) vs 28(21.5-37)	25(22.5-28) vs 28 (20-37)
Duration of Diabetes (years)	15(7-18.5) vs 10 (7-16.5)	8 (7-11) vs 12.5(7.3-18) *	9 (6-15) vs 13 (8-18)	13 (8-16) vs 12 (7-18)
Gender Females n (%)	21 (61.8) vs 32 (46.4)	6 (40) vs 47 (53.4)	20 (51.3) vs 33 (51.6)	3 (37.5) vs 50 (52.6)
BMI (Kg/m²)	23.3 ± 3.8 vs 22.3 ± 3.4	22.7 ± 3.2 vs 22.6 ± 3.6	22.9 ± 3.6 vs 22.5 ± 3.5	20.4 ± 2.6 vs 22.8 ± 3.6
Insulin Dose (IU/kg/day)	0.9 (0.7-1.1) vs 0.8 (0.6-1.05)	0.7 (0.5-0.99)vs 0.8 (0.7-1.1)	0.8 (0.6-1.0) vs 0.8 (0.7-1.2)	1.0 (0.5-1.1) vs 0.8 (0.6-1.06)
sBP (mmHg)	116 (109-130) vs 110 (100-125)	109 (100-125)vs 114 (104-128)	109 (100-130) vs 116 (107-126)	118 (105-138) vs 113 (103-126)
dBp (mmHg)	74.0 ± 11.1 vs 69.9 ± 12.8	65.4 ± 11.6 vs 72.2 ± 12.3 **	69.6 ± 13.3 vs 72.3 ± 11.8	74.6 ± 12.2 vs 70.9 ± 12.4
Use of ACEi /ARB n (%)	5 (28) vs 9 (21)	1 (11) vs 13 (25)	5 (25) vs 9(22)	1 (33) vs 13 (22)

Values presented as mean ± standard deviation or median (interquartile range) if normal or deviated distribution, respectively.

BMI, body mass index; sBP, systolic blood pressure; dBp, diastolic blood pressure; ACEi, Ace inhibitors; ARBs, angiotensin AT1 receptors blocker

* p=0.008 **p=0.047 (without correction for diabetes duration)

Table2- Laboratory data from patients with T1DM according to the presence of ACE I and D alleles and p22phox C and T alleles.

Genotypes	ACE		P22phox	
	DD vs II/DI	II vs DD/DI	CC vs CT/TT	TT vs CT/CC
A1c (%)	9.7(8.3-10.8) vs 9.5(7.7-10.5)	9.0 (7.5-11.4) vs 9.7(8.1-10.8)	9.6(7.3-11.1) vs 9.7(8.2-10.5)	10(8.5-11.7) vs 9.7(7.7-10.8)
FPG (mg/dl)	181(113-164) vs 168(97-222)	196(155-263) vs 156(99.5-249)	174(113-246) vs 171(105-259)	258(109-301) vs 169(109-226)
Post-prandial glucose (mg/dl)	211(187-339) vs 234(157-342)	236(192-304) vs 222(164-342)	220(167-299) vs 237(174-349)	193(124-352) vs 232(184-339)
GFR (ml/min)	117(98-147) vs 113(101-130)	119(103-152) vs 114(98-131)	119(98-147) vs 112(101-129)	114(105-164) vs 115(100-131)
Total Cholesterol (mg/dl)	177± 33.5 vs 175±32.4	166± 26.5 vs 177.3 ± 33.4	176.9 ± 38.6 vs 174.9 ± 28.7	154.9±28.1 vs 177.4±32.5
HDL-c (mg/dl)	49.5(41-61.3) vs 46(39.5-55.5)	47(43-50) vs 47(40-61)	47(39-61) vs 46,5(41-55)	44(39-51) vs 47(41-59)
LDL-c (mg/dl)	107.5 ± 33.1 vs 109.5 ± 24.1	100.9 ± 23.6 vs 110.2 ± 27.7	103.1±29.5 vs 112.4±.25.3	99.2±19.9 vs 109.7±.28.0
Triglycerides (mg/dl)	85.7(55.8-109) vs 67.5 (47-101.5)	69(46.5-130) vs 71.8(55.3-106)	75(56-123) vs 68.3(48.3-101)	65.6 (43.1-141.3) vs 71.5(55-107)
UAE (µg/min)	10.2 (5.5-45.4) vs 11(6.0-17.0)	11(6.1-16.9) vs 10.2 (5.7-26.6)	10.3(4.9-16.6) vs 10.3(6.1-26.6)	7.9(3.9-11.6) vs 11(5.9-26.2)

Values presented as mean ± standard deviation or median (interquartile range) if normal or deviated distribution, respectively.

A1c, glycosylated hemoglobin; FPG, fasting plasma glucose; GFR, glomerular filtration rate.

Table 3- ACE and p22phox genotypes distributions between patients with and without diabetic nephropathy., retinopathy and hypertension

Genotypes n(%)	ACE				P22phox			
	DD	DI/II	II	DI/DD	CC	CT/TT	TT	CT/CC
Nephropathy absent	22(29.3)	41/12(70.7)	12(16)	63(84)	30(40)	37/8(60)	7(9.3)	68(90.7)
Nephropathy present	12(42.9)	13/3 (57.1)	3(10.7)	25(89.3)	9(32.1)	18/1(67.9)	1(3.6)	27(96.4)
	$X^2=1.68$ p=0.194		$Fi=0.067$ p=0.499		$X^2=0.535$ p= 0.465		$Fi=0.09$ p=0.331	
Retinopathy absent	21(28.4)	42/11(71.6)	11(14.9)	63(85.1)	29(39.2)	38/7(60.8)	6(8.1)	68(91.9)
Retinopathy present	12(48)	10/3(52)	3(12)	22(88)	8(32)	15/2(68)	2(8.0)	23(92)
	$X^2=0.036$ p=0.772		$Fi=0.036$ p=0.722		$X^2=0.413$ p= 0.521		$Fi=0.002$ p=0.986	
Normal blood pressure	26(31)	45/13(69)	13(15.5)	71(84.5)	31(36.9)	46/7(63.1)	6(7.1)	78(92.9)
Hipertension	8(42.1)	9/2(57.9)	2(10.5)	17(89.5)	8(42.1)	9/2(57.9)	2(10.5)	17(89.5)
	$X^2=0.872$ p=0.351		$Fi=0.054$ p=0.581		$X^2=0.178$ p=0.673		$Fi=0.049$ p=0.619	

Data shown as n (%)

Table 4- Distribution of ACE and p22phox genotypes combinations according to the presence or absence of nephropathy, retinopathy and hypertension

	ACE + p22phox			
	DD+CC	DD+CT/TT	II/DI+CC	II/DI+CT/TT
Nephropathy absent	11(14.7)	11(14.7)	19(25.3)	34(44.3)
Nephropathy present	5(17.9)	7(25)	4(14.3)	12(42.9)
			<i>Fi</i> =0.156	
			p=0.471	
Retinopathy absent	12(16.2)	9(12.2)	17(23)	36(48.6)
Retinopathy present	4(16)	8(32)	4(16)	9(36)
			<i>Fh</i> =0.233	
			p=0.147	
Normal blood pressure	11(13.1)	15(17.9)	20(23.8)	38(45.2)
Hipertension	5 (26.3)	3(15.8)	3(15.8)	8(42.1)
			<i>Fi</i> =0.148	
			p=0.520	

REFERENCES

- 1- American Diabetes Association. Diabetes statistics for Youth. <http://www.diabetes.org/utills/printthispage.jsp>, 2004.
- 2- Walsh MG, Zgibor J, Borch-Johnsen K, Orchard TJ, DiaComp investigators. A multinational comparison of complications assessment in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27(7): 1610–1617.
- 3- American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2008; 31:596.
- 4- Mathiesen ER, Ronn B, Storm B, Foght H, Deckert T. The natural course of microalbuminuria in insulin-dependent diabetes: a 10-year prospective study. *Diabet Med*. 1995;12: 482 – 7.
- 5-Heerebeek LV, Meischl C, Stoker W, Meijer CJLM, Niessen HWM, Roos D. NADPHoxidase: new source of reactive oxygen species in the vascular system? *J Clin Pathol*. 2002; 55: 561-68.
- 6- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*.1990; 86: 1343-6.
- 7-Tiret L, Visvikis BRS, Breda C, Corvolt P, Cambien F, Soubriert F. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet*. 1992; 51:197-205.
- 8- Weekers L, Bouhanick B, Hadjadj S, Gallois Y, Roussel R, Pean F, et al. Modulation of the renal response to ace inhibition by ace insertion/deletion polymorphism during hyperglycemia in normotensive, normoalbuminuric type 1 diabetic patients. *Diabetes*. 2005; 54(10): 2961-7.
- 9-Guzik TJ, West NEJ, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Functional Effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation*. 2000; 102: 1744-7.
- 10- Moreno M, Gorra SJ, Fortuno A, Beloqui O, Diez J, Zalba G. The C242T CYBA polymorphism of NADPH oxidase is associated with essential hypertension. *J Hypertens*. 2006; 24(7): 1299-1306.
- 11- Zafari AM, Davidoff MN, Austin H, Valppu L, Cotsonis G, Lassegue B, et al. The A640G and C242T p22phox polymorphisms in patients with coronary artery disease. *Antioxid Redox Signal*. 2002; 4(4): 675-80.
- 12- Li A, Prasad A, Mincemoyer R, Satorius C, Epstein N, Finkel T, et al. Relationship of the C242T p22phox polymorphism to angiographic coronary artery disease and endothelial function. *Am J Med Genet*. 1999; 86(1): 57-61.
- 13- Gardemann A, Mages P, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. The p22phox A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. *Atherosclerosis*. 1999; 145(2): 315-23.
- 14- Castejon AM, Bracero J, Hoffmann IS, Alfieri AB, Cubeddu LX. NAD(P)H oxidase p22phox gene C242T polymorphism, nitric oxide production, salt sensitivity and cardiovascular risk factors in Hispanics. *J Human Hypertens*. 2006; 20: 772-779.

15- Matsunaga-Irie S, Maruyama T, Yamamoto Y, Motohashi Y, Hirose H, Shimada A, et al. Relation between development of nephropathy and the p22 phox C242T and receptor for advanced glycation end product G1704T gene polymorphism in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2004; 27: 303-307.

16- Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Sakamoto K, Ohtoshi K, Katakami N, et al. Association of NADPH oxidase p22 phox gene variation with advanced carotid atherosclerosis in Japanese type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003; 26: 458-463.

17- Santos KG, Canani LH, Gross JL, Tschiedel B, Souto KE, Roisenberg I. Relationship of p22phox C242T polymorphism with nephropathy in type 2 diabetic patients. *J Nephrol*. 2005; 18: 733-8.

18- Lim SC, Goh SK, Lai YR, Tee WW, Hoh A, Xu XH, et al. Relationship between common functional polymorphisms of the p22 phox gene (-930A>G and +242C>T) and nephropathy as a result of type 2 diabetes in a Chinese population. *Diabet Med*. 2006; 23:1037-41.

19- Soccio M, Pandolfi A, Di Castelnuovo A, Carluccio M, Ciccarone E, Toniato E, et al. NADPH oxidase C242T gene variations and cardiovascular protection. *J Thromb Haemost*. 2003; 11 (Suppl):12-8.

20- Hodgkinson AD, Millward BA, Demaine AG. Association of the p22phox component of NADPH oxidase with susceptibility to diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2003; 26: 3111-5.

21- JNC 7. The seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. U.S. Department of Health and Human Services. National Institute of Health. National Heart, Lung and Blood Institute. NIH Publication No 03-5233 December 2003.

22- The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics*. 2004; 114: 555-75.

23- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972; 14:499-502.

24- Schwartz GJ, Feld LG, Langford DJ: A simple estimate of glomerular filtration rate in full-term infants during the first year of life. *J Pediatr*. 1984; 104:849-54.

25-Gault MH, Longerich LL, Harnett JD, Wesolowski C: Predicting glomerular function from adjusted serum creatinine. *Nephron*. 1992; 62:249-56.

26- Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K, Yamada S, Akita H, Yokoyama M. Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22phox gene in Patients with Coronary Artery Disease. *Circulation*. 1998; 97:135-7.

27-Van Ittersum FJ, de Man AM, Thijssen S, de Knijff P, Slagboom E, Smulders Y, et al. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and complications of insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15(7): 1000-7.

- 28- de Azevedo MJ, Dalmáz CA, Caramori ML, Pecis M, Esteves JF, Maia AL, Gross JL. ACE and PC-1 gene polymorphisms in normoalbuminuric type 1 diabetic patients: a 10-year prospective study. *J Diabetes Complicat.* 2002; 16(4):255-62.
- 29- De Cosmo S, Miscio G, Zucaro L, Margaglione M, Argiolas A, Thomas S, et al. The role of PC-1 and ACE genes in diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients: evidence for a polygenic control of kidney disease progression. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17(8):1402-7.
- 30- Rudberg S, Rasmussen LM, Bangstad HJ, 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.* 2000; 23: 544-8.
- 31- Björck S, Blohmé G, Sylvén C, Mulee H. Deletion insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 1997; 12: 67-70.
- 32- Bouhanick B, Gallois Y, Hadjadj S, Casson FB, Limal JM, Marre M. Relationship between glomerular hyperfiltration and ACE insertion/deletion polymorphism in type 1 diabetic children and adolescents. *Diabetes Care.* 1999; 22: 618-22.
- 33- Hadjadj S, Belloum R, Bouhanick B, Gallois Y, Guilloteau G, Chatellier G, et al. Prognostic value of angiotensin-I converting enzyme I/D polymorphism for nephropathy in type 1 diabetes mellitus: a prospective study. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12(3): 541-9.
- 34- Boright AP, Paterson AD, Mirea L, Bull SB, Mowjoodi A, Scherer SW, et al. Genetic variation at the ACE gene is associated with persistent microalbuminuria and severe nephropathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC genetics study. *Diabetes.* 2005; 54:1238-44.
- 35- Costacou T, Chang Y, Ferrell RE, Orchard TJ. Identifying genetic susceptibilities to diabetes-related complications among individuals at low risk of complications: an application of tree-structured survival analysis. *Am J Epidemiol.* 2006; 164: 862-72.
- 36- Tarnow L, Glud C, Parving H-H. Diabetic nephropathy and the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13: 1125-30.
- 37- Barnas U, Schmidt A, Illievich A, Kiener H P, Rabensteiner D, Kaider A, et al. 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.* 1997; 40(3): 327-31.
- 38- Otani A, Takagi H, Suzuma K, Honda Y. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. *Circ Res.* 1998; 82: 619-28.
- 39- The EUCLID Study Group. Randomised placebocontrolled trial of lisinopril in normotensive patients with insulin-dependent diabetes and normoalbuminuria or microalbuminuria. *Lancet.* 1997; 349: 1787-92.
- 40- Ceriello A, Kumar S, Piconi L, Espósito K, Giugliano D. Simultaneous control of hyperglycemia and oxidative stress normalizes endothelial function in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2007; 30:649-54.
- 41- Dahl-Jorgensen K, Larsen JR, Hanssen KF. Atherosclerosis in childhood and adolescent type 1 diabetes: early disease, early treatment? *Diabetologia.* 2005; 48:1445-53.

42-Rönnback M, Fagerudd J, Forsblom C, Pettersson-Fernholm K, Reunanen A, Per-Henrik Groop and on behalf of the Finnish Diabetic Nephropathy. Altered age-related blood pressure pattern in type 1 diabetes. *Circulation*. 2004; 110:1076-82.

43-Giannattasio C, Failla M, Piperno A, Grappiolo A, Gamba P, Paleari F, et al. Early impairment of large artery structure and function in type I diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1999; 42: 987-94.

ANEXO A

ANEXO B



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DISCIPLINA DE DIABETES E METABOLOGIA**

TERMO DE CONSENTIMENTO

O estudo "Investigação de polimorfismos genéticos da enzima conversora da angiotensina e NADPH oxidase em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1" está sendo desenvolvido pela Dra Roberta Arnoldi Cobas do serviço de Diabetes e Metabologia no Hospital Universitário Pedro Ernesto.

Os pacientes com Diabetes tipo 1 têm um maior risco de desenvolver problemas relacionados com a formação de placas ateroscleróticas em seus vasos (deposição de gordura nos vasos) e complicações renais e oculares da doença. Este estudo visa investigar se o maior risco está relacionado com o descontrole do Diabetes e da dislipidemia (gordura no sangue), hipertensão arterial (pressão alta) e microalbuminúria (perda de proteínas pelos rins) se presentes. Será avaliado também se os participantes apresentam maior frequência de polimorfismos genéticos determinantes de doença cardiovascular (os gens contêm as informações que são passadas de pais para filhos). Polimorfismos genéticos são variações que estes gens podem apresentar.

Objetivamos também comparar se pacientes diabéticos tipo 1 têm diferentes distribuições destes polimorfismos em relação a indivíduos não portadores de Diabetes tipo 1, motivo pelo qual precisamos da participação de indivíduos não diabéticos.

Caso eu decida participar:

1. Serão fornecidas informações orais e escritas prévias sobre o estudo realizado.
2. Não serei pago pela minha participação no estudo.
3. Os dados obtidos no exame serão utilizados para publicação, mas a minha identidade não será revelada em nenhum momento.
4. A coleta de sangue será realizada em uma veia do braço e pode ser que fique uma mancha roxa no local da punção venosa
5. O material colhido será enviado ao laboratório de HLA da UERJ para avaliação dos polimorfismos genéticos.

Nome do participante _____

Assinatura do participante _____

Dra Roberta Arnoldi Cobas _____