

Guilherme Pozueco Zaffari<sup>1,3</sup>, Denise Alves Sortica<sup>1</sup>, Camila Pocharski Barbosa<sup>1</sup>, Daisy Crispim<sup>1,2</sup>  
e Luís Henrique Canani<sup>1,2</sup>

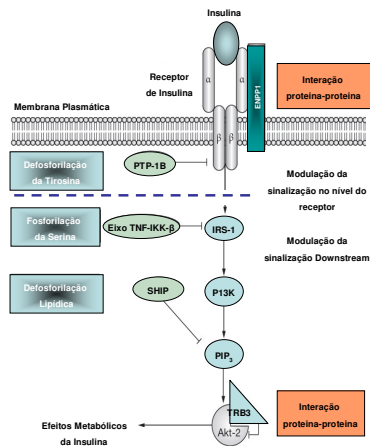
1- Serviço de Endocrinologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 2- PPG em Ciências Médicas: Endocrinologia – UFRGS; 3- Faculdade de Medicina - UFRGS

Porto Alegre, RS. Email: luiscanani@yahoo.com

INTRODUÇÃO

A nefropatia diabética (ND) é uma complicação crônica do diabetes mellitus, a qual está associada à elevada morbidade e mortalidade e atinge em torno de 30% dos indivíduos com DM sendo responsável por mais de um terço dos novos casos de insuficiência renal em indivíduos no início do programa de diálise. A ND tem um importante componente genético, além dos conhecidos fatores de risco ambientais. A *ENPP1* (*ecto-nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase 1*) é uma proteína expressa na membrana celular de vários tecidos, incluindo os rins. Foi encontrado que níveis aumentados de expressão da *ENPP1* inibem a atividade tirosina-quinase do receptor da insulina em vários tipos celulares, causando resistência à insulina (RI). A expressão aumentada de *ENPP1* inibe a sinalização da insulina em vários tipos celulares *in vitro*, parecendo estar fortemente associada ao receptor da insulina na superfície celular (Figura 1). Em humanos, portadores do alelo Q tem maior RI e hiperinsulinemia do que não portadores. A hiperinsulinemia pode estimular a reabsorção renal de sódio, levando a expansão do volume, aumento da atividade simpático-adrenérgica e aumento da expressão do receptor da angiotensina tipo II, o que ocasiona um prejuízo na vasodilatação periférica. O volume aumentado e o prejuízo da vasodilatação periférica podem predispor ao aumento da pressão arterial e a uma diminuição no descenso noturno da pressão sanguínea, sendo estas características reconhecidamente fatores de risco para ND. Sendo assim, o gene *ENPP1* é um gene candidato para a RD. De fato, o polimorfismo K121Q (A/C) foi associado com ND em diferentes populações. O polimorfismo K121Q DO gene *ENPP1* está associado com RI e com o desenvolvimento de ND.

Figura 1



Sortica et al. 2011; Submetido aos Arq Bras Endocrinol Metab

OBJETIVO

O objetivo deste estudo é analisar a expressão gênica da *ENPP1* em biópsias de tecido renal humano de acordo com os diferentes genótipos do polimorfismo K121Q.

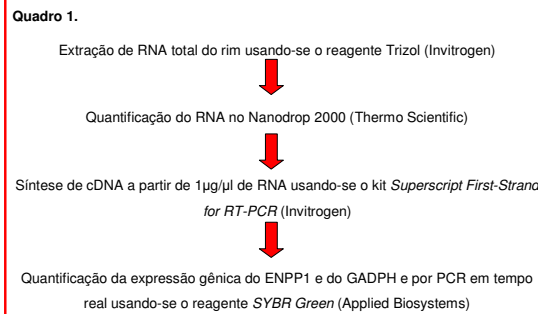
MATERIAIS E MÉTODOS

➤ **Amostras:** Serão analisados 100 indivíduos provenientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Grupo Hospitalar Conceição, os quais sofreram nefrectomia radical terapêutica para tratamento de tumores renais malignos. Pacientes com outras doenças renais estabelecidas foram excluídos. Até o momento, foram coletados 50 biópsias tecido renal não atingido pelo tumor. De cada indivíduo analisado também estão sendo coletados uma amostra de sangue periférico, para extração de DNA total e realização da genotipagem do polimorfismo bem como alguns dados clínicos e laboratoriais relevantes ao projeto. O projeto foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Grupo Nossa Senhora da Conceição. Todos os pacientes assinam o termo de consentimento livre e esclarecido antes da coleta.

➤ **Análise molecular:**

- **Genotipagem do polimorfismo:** A genotipagem do polimorfismo K121Q no gene *ENPP1* foi realizada através da técnica de discriminação alélica por PCR em tempo real, usando-se sondas do tipo TaqMan MGB (Applied Biosystems).

- **Expressão gênica do *ENPP1* no tecido renal:** A quantificação do cDNA do *ENPP1* está sendo feita pela técnica de PCR em tempo real, método da curva padrão relativa, utilizando-se o gene *GADPH* como referência (quadro 1). Conforme número amostral calculado, serão avaliados pelo menos 15 indivíduos em cada grupo de genótipo.



➤ **Análises estatísticas:** As variáveis clínicas foram comparadas entre indivíduos com os diferentes genótipos do polimorfismo estudado pelo teste  $\chi^2$  ou teste-t, de acordo com o apropriado. As análises estatísticas foram feitas no programa SPSS 18.0 e um  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

➤ Todos os 50 indivíduos já incluídos no estudo foram genotipados para o polimorfismo K121Q. Foram encontrados 3 indivíduos com o genótipo C/C (7%), 14 com o genótipo A/G (32,6%) e 26 com o A/A (60,5%). As frequências genotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p = 0,567$ ). A frequência do alelo C foi 23,2%.

➤ Na Tabela 1 estão apresentadas as características clínicas dos pacientes de acordo com a presença do alelo de risco C do polimorfismo K121Q no gene *ENPP1*. Características como idade, gênero, presença de hipertensão arterial e tabagismo não diferiram entre os dois grupos de genótipos.

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes de acordo com a presença do alelo C do polimorfismo K121Q do gene *ENPP1*

	Genótipos do polimorfismo K121Q		
	A/C+C/C (n = 26)	A/A (n = 17)	p
Idade (anos)	58,08 ± 14,10	56,4 ± 16,4	0,678
Sexo Masculino (%)	61,1	38,9	0,941
HAS (%)	70,4	29,6	0,125
Tabagismo (%)	66,7	33,3	0,095

Os dados são descritos como média ± desvio padrão ou porcentagem. HAS = hipertensão arterial.

➤ A técnica de extração de RNA do gene *ENPP1* já foi padronizada e realizada até o momento em 50 amostras, o que representa um total de 50% do número amostral calculado.

➤ Já foi determinado um *pool* de amostras que constituirá a curva padrão para análise de expressão e estamos padronizando as condições de PCR para avaliar a expressão gênica. Entretanto, já observamos que a *ENPP1* é realmente expressa no rim humano.

CONCLUSÃO

➤ Estes são resultados preliminares. O andamento do projeto está ocorrendo conforme o esperado, as amostras continuam sendo coletadas para que o número amostral seja atingido. Conforme análise interina realizada, os grupos são semelhantes em relação às características clínicas dos indivíduos e o alelo de risco. Os dados de expressão gênica ainda estão em fase de padronização.