

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**O PAPEL DOS POLIMORFISMOS DE DNA RELACIONADOS AO ESTRESSE
OXIDATIVO E À DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA PATOGÊNESE DAS
COMPLICAÇÕES CRÔNICAS DO DIABETES MELLITUS**

Kátia Gonçalves dos Santos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da UFRGS
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Israel Roisenberg

Porto Alegre, março de 2005

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemostasia do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Grupo Hospitalar Conceição, em Porto Alegre, sob o apoio financeiro do CNPq, FINEP e PRONEX.

“(...) Ao contrário do que pretendem os livros didáticos, a melhor parte da ciência não está nos modelos matemáticos nem nos experimentos. Isso vem depois. O melhor da ciência emerge de um modo mais primitivo de pensar através do qual a mente do caçador vai tecendo idéias a partir de fatos velhos, metáforas novas e imagens confusas e semi-ensandecidas de coisas vistas recentemente. Avançar na ciência é elaborar novos padrões de pensar, que definirão por sua vez os modelos e os experimentos. Fácil de dizer, difícil de fazer”.

(Edward O. Wilson, *Diversidade da Vida*, 1994)

Agradecimentos mais do que especiais:

A todos os **pacientes e familiares** que me confiaram suas angústias e esperanças e que, apesar de todas as dificuldades, compreenderam a dimensão do objetivo proposto, incentivando e acreditando na realização deste trabalho. Sem eles, nada disso seria possível.

Ao **Prof. Israel**, por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório, pela irrestrita liberdade de expressão, pela confiança incondicional depositada em mim ao longo de todo o trabalho, por me conduzir na carreira científica e ensinar o lado humano da ciência.

Ao **Balduino**, pelo dinamismo, pela energia contagiante, por ter sido responsável pela minha iniciação no mundo da diabetologia e, especialmente, pela colaboração indispensável ao longo dos últimos seis anos.

Ao **Prof. Jorge Gross**, por seu constante incentivo para o aprimoramento profissional e pela busca de novos desafios.

Ao **Luís Henrique**, por sua amizade, sua imensa capacidade de estar sempre disponível para solucionar dúvidas, apontar soluções e prover comentários críticos e sugestões de extrema relevância.

À **Kátia**, por ter se envolvido de forma espontânea com este trabalho e auxiliado decisivamente para a realização do mesmo, pelos conhecimentos adquiridos, carisma, apoio e disposição irrepreensíveis.

Ao **João**, por acreditar na importância deste trabalho e colaborar de forma decisiva e espontânea, e pelos conhecimentos transmitidos.

À **Daisy**, pelo companheirismo, pelo apoio constante, por compartilhar as alegrias e as pequenas decepções, por auxiliar a encontrar soluções para os obstáculos cotidianos, e pela amizade desde a graduação.

Aos **colegas** de laboratório, pelos questionamentos, sugestões e esclarecimentos, pelo apoio, e pelo café acompanhado de bolachas recheadas nos momentos mais cruciais.

À **Jussara** pelo apoio e energia despendida na elaboração de parte do questionário utilizado na entrevista dos pacientes. Aos demais membros do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por seu apoio.

Ao **Prof. Hugo Lisbôa** pelo seu envolvimento na etapa fundamental da seleção dos pacientes e coleta de amostras e aos demais participantes do projeto “A Genética do DM e de suas Complicações Crônicas”.

À **Silvana, Daniela, Fábio, Rafael** e demais profissionais do Grupo Hospitalar Conceição por terem nos recebido de forma alegre, simpática e com disposição para auxiliar no que fosse preciso.

À **Marilu**, pela disposição para trocar idéias e solucionar dúvidas.

Aos **professores** do PPGGBM, aos **colegas** em geral e a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao **Elmo**, por demonstrar que é possível descomplicar o que pode ser simplificado.

Aos **examinadores** desta tese de doutorado pela disposição em abdicar de seus compromissos para compartilhar a realização de um sonho que se constitui em uma etapa fundamental da minha carreira científica.

À **minha família**, que a seu modo colaborou para a realização deste trabalho, e a quem sou eternamente grata.

Aos **meus avós**, em especial, grandes guerreiros que me ensinaram os verdadeiros valores da vida.

Ao **Diego**, por compartilhar uma longa jornada de desafios, de crescimento pessoal e profissional, pelas críticas e sugestões construtivas, por seu amor, paciência e dedicação, por me apoiar em todos os momentos mesmo quando eu não tinha razão, e por ter feito com que eu me tornasse uma pessoa melhor e mais feliz.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	18
1.1. O Diabetes Mellitus (DM)	19
1.1.1. Os tipos de DM	20
1.1.2. A epidemiologia do DM2	23
1.2. As Complicações Crônicas do DM	25
1.2.1. A retinopatia diabética (RD)	28
1.2.2. A nefropatia diabética (ND)	30
1.2.3. A cardiopatia isquêmica (CI)	34
1.3. A Patogênese das Complicações Crônicas do DM	39
1.3.1. A disfunção endotelial	40
1.3.2. O estresse oxidativo	43
1.3.3. A disfunção endotelial e o estresse oxidativo	46
1.4. A Genética das Complicações Crônicas do DM	49
1.4.1. A genética da retinopatia e da nefropatia diabéticas	49
1.4.2. A genética da doença arterial coronariana e do infarto agudo do miocárdio	57
1.4.3. O receptor dos produtos finais de glicação avançada (RAGE)	60
1.4.4. A aldose redutase (AR)	64
1.4.5. A óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS, ecNOS, NOS3)	68
1.4.6. As paraoxonases 1 e 2 (PON1 e PON2)	71
1.4.7. A NAD(P)H oxidase vascular	76
1.4.8. A catalase (CAT)	79

CAPÍTULO II: OBJETIVOS	82
CAPÍTULO III: “The –374A allele of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene is associated with a decreased risk of ischemic heart disease in African-Brazilians with type 2 diabetes”	85
CAPÍTULO IV: “The –106C>T polymorphism of the aldose reductase gene is associated with microangiopathy in type 2 diabetes”	114
CAPÍTULO V: “The paraoxonase gene (-108)C/Arg192/Ser311 haplotype is associated with increased susceptibility to microangiopathy in African-Brazilian Type 2 diabetic patients”	144
CAPÍTULO VI: “Polymorphisms of PON1 gene are associated with ischaemic heart disease in type 2 diabetes”	170
CAPÍTULO VII: “p22phox C242T polymorphism is associated with an increased risk of overt nephropathy in Caucasian smokers with Type II diabetes”	197
CAPÍTULO VIII: DISCUSSÃO	228
8.1. A hipótese da “doença comum/variante comum” e o modelo das variantes raras	230
8.2. Os métodos de identificação dos alelos de susceptibilidade para as doenças complexas	231
8.3. Os estudos de associação do tipo caso-controle	232
8.3.1. A seleção dos casos e controles	233
8.3.2. A seleção dos genes candidatos	234
8.3.3. O tamanho amostral	236
8.3.4. A estratificação populacional	237
8.3.5. O tempo de duração do DM	238

8.3.6. A coexistência das complicações crônicas	240
8.3.7. Os exames e os critérios diagnósticos das complicações crônicas	243
8.3.8. O viés de publicação	245
8.3.9. A disfunção endotelial	245
8.3.10. O estresse oxidativo	246
8.4. Os estudos de associação com haplótipos	247
8.4.1. Os blocos haplotípicos	251
8.5. Os estudos de associação em populações de origem africana	252
8.6. A interação gene-gene e gene-ambiente	254
8.7. A paraoxonase 1 (PON1)	255
8.8. A óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e a NAD(P)H oxidase	257
8.9. A catalase (CAT)	258
8.10. A validação dos polimorfismos na população em geral	260
CAPÍTULO IX: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	265
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	270
ANEXOS	295
ANEXO I – Ficha clínica de avaliação do paciente diabético e termo de consentimento informado	296
ANEXO II – Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos 703 pacientes com DM2 analisados no presente estudo	310
ANEXO III – Tabela 2. Frequências gênicas e genotípicas obtidas para os 11 polimorfismos analisados no presente estudo	311
ANEXO IV – Tabela 3. Frequências haplotípicas obtidas para os polimorfismos nos genes do RAGE, da eNOS e da PON1/PON2	315

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	aldose redutase
CAT	catalase
CI	cardiopatia isquêmica
DM	diabetes mellitus
eNOS	óxido nítrico sintetase endotelial
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
GPX	glutathione peroxidase
GSH	glutathione
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HDL	lipoproteína de alta densidade
IMC	índice de massa corporal
LD	desequilíbrio de ligação
LDL	lipoproteína de baixa densidade
NAD(P)H	nicotina adenina dinucleotídeo (fosfato) reduzida
ND	nefropatia diabética
NO	óxido nítrico
O₂⁻	ânion superóxido
OR	“odds ratio” (razão de chances)
PKC	proteína cinase C
PON	paraoxonase
RAGE	receptor para os produtos finais de glicação avançada

RD	retinopatia diabética
RFLP	polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
SNP	“single nucleotide polymorphism” (mutação de ponto)
SOD	superóxido dismutase
TDT	teste de desequilíbrio de transmissão
UKPDS	“United Kingdom Prospective Diabetes Study”
UTR	“untranslated region” (região não traduzida)

RESUMO

Introdução: O diabetes mellitus (DM) constitui um grave problema de saúde pública, em razão de sua elevada prevalência e acentuada morbidade e mortalidade, decorrentes das complicações micro- e macroangiopáticas. De acordo com a intensidade e o tempo de exposição à hiperglicemia, ocorrem lesões estruturais e funcionais no endotélio dos vasos sanguíneos em vários órgãos e tecidos. As principais microangiopatias são a retinopatia (RD), a nefropatia (ND) e a neuropatia diabéticas. A macroangiopatia diabética consiste, principalmente, de uma forma acelerada de aterosclerose que afeta as artérias coronarianas, cerebrovasculares e periféricas. As principais manifestações clínicas da doença arterial coronariana no DM são a angina e o infarto agudo do miocárdio, coletivamente denominados de cardiopatia isquêmica (CI).

Os estudos populacionais e familiares têm demonstrado que as angiopatias diabéticas são multifatoriais, cuja patogênese depende da interação entre vários fatores genéticos e ambientais. Como o estresse oxidativo tem sido reconhecido como um dos principais mecanismos envolvidos na disfunção endotelial, que caracteriza as complicações crônicas do DM, os possíveis genes candidatos para estas complicações são aqueles que codificam produtos envolvidos no metabolismo da glicose e na homeostasia vascular.

Objetivo: O presente estudo de caso-controle teve por objetivo analisar a relação entre 11 polimorfismos de DNA distribuídos em 7 genes relacionados ao estresse oxidativo e à disfunção endotelial e a ocorrência e/ou a severidade das complicações crônicas do DM tipo 2 (DM2), a saber: -429T>C, -374T>A e I/D 63-pb, no gene do RAGE; -106C>T, no gene da AR; -786T>C e 894G>T, no gene da eNOS; -108T>C e Q192R, no gene da PON1; S311C, no gene da PON2; 242C>T no gene CYBA; e -262C>T, no gene da CAT.

Materiais e Métodos: A população de estudo foi composta por 703 pacientes com DM2 (520 caucasóides e 183 negróides), participantes de um estudo multicêntrico no Estado do Rio Grande do Sul. Todos os pacientes foram submetidos a exame físico, entrevista por meio de questionário padronizado e exames específicos para o diagnóstico da RD, ND e CI. A análise dos polimorfismos foi realizada por meio da técnica de PCR-RFLP e modelos de regressão logística multivariada foram elaborados para controlar para os fatores de risco independentes associados com a RD, a ND ou a CI. Amostras provenientes de 200 doadores de banco de sangue (100 caucasóides e 100 negróides) também foram genotipadas.

Resultados: Dos 11 polimorfismos analisados, observou-se que 6 variantes estiveram associadas à presença de uma ou mais complicações crônicas. Em caucasóides com DM2, o genótipo –106CC no gene da AR se constituiu em fator de risco para a RD proliferativa. Também foram identificados três importantes fatores de interação neste grupo étnico. O alelo –108C no gene da PON1 foi associado ao aumento do risco de CI entre os pacientes com menos de 54 anos de idade. Já o alelo 192R (também no gene da PON1) foi associado ao risco aumentado de CI entre os fumantes. Por fim, o alelo 242T no gene CYBA se constituiu em fator de risco para a nefropatia clínica entre os fumantes.

Quanto aos pacientes negróides, o alelo –374A no gene do RAGE se revelou como um fator de proteção para a CI, ao passo que o alelo –108T se constituiu em fator de risco para esta complicação. Já o alelo –106C foi associado ao aumento no risco de desenvolvimento de ND e de progressão para a nefropatia clínica. Além disso, o haplótipo –108C/192R/311S estava associado ao risco aumentado de retinopatia e nefropatia diabéticas.

Para os demais polimorfismos não foram obtidas quaisquer evidências de associação entre essas variantes e a presença de RD, ND ou CI, tanto em caucasóides como em negróides. Em termos populacionais, a maior parte dos polimorfismos analisados apresentaram uma grande variabilidade alélica, genotípica e haplotípica entre caucasóides e negróides.

Conclusões e perspectivas futuras: Os genes que codificam produtos relacionados à função endotelial e ao balanço redox intracelular se constituem em genes candidatos em potencial para a identificação dos alelos de susceptibilidade para as complicações crônicas do DM. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a análise de haplótipos pode ser mais profícua do que a análise individualizada de SNPs na identificação das variantes genéticas associadas com as complicações crônicas. Além disso, nossos resultados enfatizam a importância de analisar os fatores ambientais que podem interagir com os fatores de risco genéticos na susceptibilidade para as complicações vasculares, pois existem subgrupos de pacientes que são mais propensos ao desenvolvimento das complicações crônicas do DM. A identificação desses pacientes pode auxiliar no diagnóstico mais precoce e na prevenção das angiopatias diabéticas por meio da intervenção nos fatores de risco ambientais/comportamentais, especialmente nos indivíduos que apresentam fatores de risco genéticos adicionais para essas complicações.

ABSTRACT

Background: Diabetes mellitus (DM) is a serious public health problem because of its high prevalence and marked morbidity and mortality, due to the micro- and macroangiopathic complications. According to the level and the duration of exposition to hyperglycemia, structural and functional damage occur in the endothelium of the blood vessels in various organs and tissues. The main microangiopathies are the diabetic retinopathy (DR), the diabetic nephropathy (DN) and the diabetic neuropathy. The diabetic macroangiopathy consists mainly of a pattern of accelerated atherosclerosis that affects the coronary, cerebrovascular and peripheral arteries. The main clinical manifestations of the coronary artery disease in diabetic patients are the angina and the acute myocardial infarction, collectively so-called ischemic heart disease (IHD).

Population and family studies have shown that the diabetic angiopathies are multifactorial, whose pathogenesis depends upon the interaction of several genetic and environmental risk factors. As the oxidative stress has been recognized as one of the main mechanisms related to the endothelial dysfunction, which characterizes the chronic complications of DM, the possible candidate genes for these complications are those that code for products involved in the glucose metabolism and in the vascular homeostasis.

Aim: The aim of this case-control study was to analyze the relationship between 11 DNA polymorphisms distributed in 7 genes related to the oxidative stress and to endothelial dysfunction and the occurrence and/or the severity of the chronic complications of type 2 diabetes (DM2), namely: -429T>C, -374T>A and I/D 63-pb, in the RAGE gene; -106C>T, in the AR gene; -786T>C and 894G>T, in the eNOS gene; -108T>C and Q192R, in the PON1 gene; S311C, in the PON2 gene; 242C>T in the CYBA gene; and -262C>T, in the CAT gene.

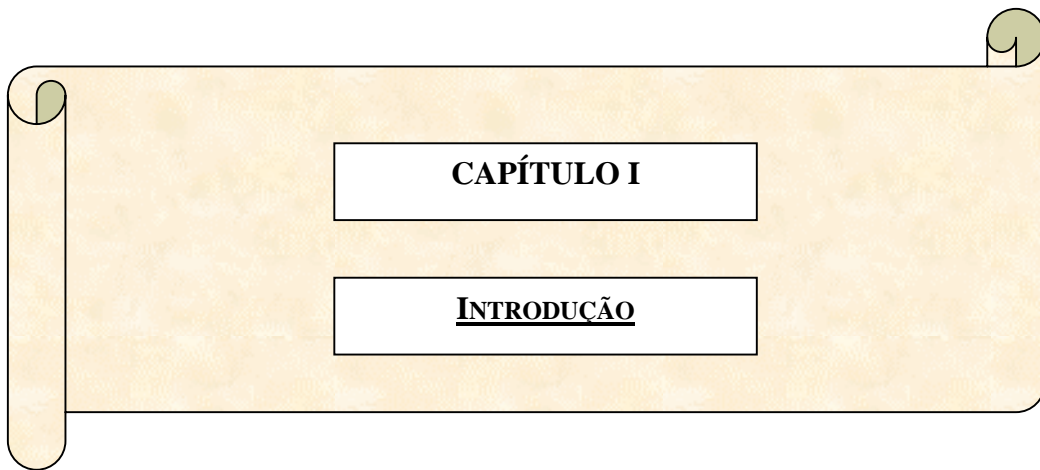
Materials and Methods: The study population was composed of 703 patients with DM2 (520 Caucasian- and 183 African-Brazilians), participating in a multicentric study in the Brazilian State of Rio Grande do Sul. All patients underwent a standardized clinical evaluation that consisted of a questionnaire, physical examination, and assessment of diabetic complications. Genotype analysis was performed using the PCR-RFLP method. Multivariate logistic regression analysis was used to control for independent risk factors associated with DR, DN or IHD. Samples from 200 anonymous blood donors (100 Caucasian- and 100 African-Brazilians) were also genotyped.

Results: Of the 11 polymorphisms analyzed, 6 variants were associated with the presence of at least one chronic complication. In Caucasians with DM2, the -106CC genotype in the AR gene was found to be a risk factor for proliferative DR. Two important interaction factors were also identified in this ethnic group. The -108C allele in the PON1 gene was associated with an increased risk of IHD only among individuals who were ≤ 54 years. Whereas the 192R allele (also located on the PON1 gene) was associated with an increased risk of IHD among smokers. Finally, the 242T allele in the CYBA gene was found to be a risk factor for overt nephropathy among smokers.

In African-Brazilians, the -374A allele in the RAGE gene was found to be a protective factor against IHD, whereas the -108T allele was found to be a risk factor for this complication. The -106C allele was found to be a risk factor for the development of DN and progression to overt nephropathy. Apart from this, the -108C/192R/311S haplotype was associated with an increased risk of diabetic retinopathy and nephropathy.

For the other polymorphisms there were no evidences of association between these variants and the presence of DR, DN or IHD, in either of the ethnic groups. In relation to the population study, most of the polymorphisms analyzed presented a marked allele, genotype and haplotype variability between Caucasian- and African-Brazilians.

Conclusions and future perspectives: The genes that code for products related to the endothelial function and to the redox balance are potential candidate genes for identifying the susceptibility alleles for the chronic complications of DM. The results obtained in the present study show that the haplotype analysis may be more powerful than the individual analyses of SNPs in the task of identifying the genetic variants associated with the chronic complications. Moreover, our findings reinforce the importance of analyzing the environmental factors that may interact with the genetic risk factors in the susceptibility of vascular complications, as there exist subgroups of patients who are more prone to develop the chronic complications of DM. The identification of these patients may help in the early diagnosis and in the prevention of the diabetic angiopathies through the intervention in the environmental/behavioral risk factors, especially in those individuals who have additional genetic risk factors for these complications.



1. INTRODUÇÃO

1.1. O Diabetes Mellitus (DM)

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina, que altera o metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. A hiperglicemia crônica no DM está associada à disfunção e à falência, a longo prazo, de múltiplos órgãos, afetando principalmente os rins, os olhos e o coração (Masharani *et al.*, 2004; American Diabetes Association, 2005).

O DM pode ser etiologicamente classificado em quatro categorias principais: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos de DM e DM gestacional. Apesar de apresentarem etiologias distintas que explicam as diferenças de suas manifestações clínicas, os quatro tipos de DM têm como alteração em comum a incapacidade da manutenção da homeostase glicêmica (Masharani *et al.*, 2004; Oliveira, 2004).

Os indivíduos que apresentam níveis glicêmicos acima dos valores normais de referência, mas abaixo dos níveis que definem o DM, são considerados como intolerantes à glicose, cuja deficiência parcial no metabolismo da glicose pode ocorrer em jejum ou após as refeições (Masharani *et al.*, 2004; American Diabetes Association, 2005).

O DM constitui um grave problema de saúde pública em razão de sua elevada prevalência, acentuada morbidade e mortalidade e das repercussões econômicas e sociais decorrentes do impacto das complicações vasculares, que comprometem a qualidade de vida e a produtividade dos indivíduos afetados, além dos elevados custos requeridos para o seu tratamento (Oliveira, 2004).

1.1.1. Os tipos de DM

O diabetes do tipo 1 (DM1) resulta basicamente da destruição das células β pancreáticas, que ocasiona uma deficiência absoluta na secreção de insulina. Essa forma de DM ocorre principalmente em crianças e adolescentes de origem caucasóide. Os pacientes com DM1 são geralmente magros e apresentam quadro clínico intenso, com tendência a sofrer descompensações metabólicas severas (Masharani *et al.*, 2004; American Diabetes Association, 2005). Durante o desenvolvimento do DM1, as ilhotas pancreáticas são destruídas (motivo pelo qual ocorre a deficiência na secreção de insulina), provavelmente devido a um processo auto-imune. Frequentemente, os pacientes com DM1 apresentam anticorpos circulantes contra a insulina, contra as células β e/ou contra alguns antígenos das células β (Masharani *et al.*, 2004; American Diabetes Association, 2005).

O mecanismo fisiopatológico desencadeador desse processo não é, até o momento, completamente conhecido. Entretanto, diversas evidências sugerem que fatores ambientais, como viroses e substâncias químicas, poderiam ser os agentes desencadeadores das alterações imunológicas acima descritas em indivíduos que apresentam susceptibilidade genética ao DM1, particularmente nos portadores de determinados haplótipos do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II (Notkins, 2002; Masharani *et al.*, 2004).

O diabetes do tipo 2 (DM2) corresponde a 80-90% dos casos de DM e ocorre principalmente em indivíduos adultos após os trinta anos de idade. Os pacientes com DM2 apresentam diferentes graus de deficiência insulínica, variando desde uma pequena intolerância à glicose até a forma insulinopênica similar ao DM1, que requer tratamento com insulina exógena (Masharani *et al.*, 2004; American Diabetes Association, 2005).

O DM2 caracteriza-se por apresentar resistência à ação da insulina (que pode preceder o início do quadro clínico) e uma deficiência relativa de insulina (que se acentua com o decorrer dos anos de evolução da doença). Um terceiro fator agravante, sempre associado, é o aumento da produção hepática de glicose decorrente das duas primeiras alterações (Oliveira, 2004). Nesta forma de DM não se verifica associação com o sistema de histocompatibilidade HLA, doenças auto-imunes e viroses, assim como não há evidências de auto-imunidade das células β (DeFronzo, 2004).

Obesidade, sedentarismo, hipertensão, dislipidemia, idade avançada, história familiar de DM e diagnóstico prévio de DM gestacional ou história de macrosomia fetal, abortos de repetição ou mortalidade perinatal constituem os principais fatores de risco para o desenvolvimento de DM2 (Oliveira, 2004). Além disso, o tabagismo e o consumo de álcool também podem estar associados ao desenvolvimento de DM2 (van Dam, 2003).

A manutenção da homeostasia glicêmica normal é dependente de uma interação dinâmica e balanceada entre a secreção de insulina e a sensibilidade tissular à insulina (músculo, fígado e tecido adiposo). A evolução do DM2 requer a presença de defeitos tanto na secreção quanto na ação da insulina (DeFronzo, 2004). As evidências experimentais demonstram que: (1) os indivíduos que são susceptíveis ao desenvolvimento de DM2 herdam um ou mais genes que confere(m) resistência à insulina e uma maior propensão para a progressiva disfunção das células β ; (2) anormalidades como obesidade e metabolismo lipídico alterado, por exemplo, acentuam a deficiência na ação e secreção da insulina e; (3) o DM se desenvolve naqueles indivíduos nos quais um concomitante defeito na secreção de insulina também está presente. Assim, a hiperglicemia crônica observada nos pacientes com DM2 é resultante dos efeitos combinados da

resistência à insulina e de uma deficiência das células β em compensar para a elevada demanda de insulina (DeFronzo, 2004).

Na etapa inicial do DM2, os indivíduos podem apresentar níveis de insulina próximos ou até mesmo mais elevados do que os níveis de um indivíduo normoglicêmico. Com o passar do tempo, as células β entram em exaustão e cessam a produção de insulina (DeFronzo, 2004). Como a hiperglicemia geralmente se desenvolve de forma gradual, o DM2 é frequentemente assintomático em seus estágios iniciais. Assim, o paciente pode permanecer sem diagnóstico por vários anos. No entanto, à medida que se desenvolve, a hiperglicemia crônica provoca danos em diversos órgãos, levando ao desenvolvimento de complicações vasculares crônicas que muitas vezes são detectadas no momento do diagnóstico do DM2 (Oliveira, 2004; DeFronzo, 2004).

Os estudos populacionais e familiares têm demonstrado um importante envolvimento dos fatores genéticos na patogênese do DM2 (Reis e Velho, 2002; Florez *et al.*, 2003; DeFronzo, 2004, O'Rahilly *et al.*, 2005). Os estudos de gêmeos revelaram que a taxa de concordância entre os gêmeos monozigóticos (50-80%) é maior do que a taxa observada entre os gêmeos dizigóticos (< 20%). Além disso, há uma evidente história de recorrência familiar de DM2, na qual observa-se que o risco de desenvolver DM é maior para os parentes em primeiro grau de pacientes afetados do que para a população em geral. Já os estudos de migração demonstram uma evidente interação gene-ambiente na manifestação do DM2. Por exemplo, asiáticos que migram para a Europa e os Estados Unidos apresentam uma maior prevalência de DM2 em comparação aos asiáticos que permanecem em seus países de origem (Reis e Velho, 2002; Florez *et al.*, 2003; DeFronzo, 2004; O'Rahilly *et al.*, 2005).

Existem ainda outros tipos específicos de DM que compreendem um grupo heterogêneo de desordens hiperglicêmicas raras e que correspondem a menos de 5% de todos os casos de DM em adultos. Nesta categoria estão incluídos os defeitos monogênicos das células β , os defeitos genéticos na ação da insulina, as doenças que afetam a porção exócrina do pâncreas, as endocrinopatias, o DM induzido por substâncias químicas e infecções, as formas incomuns de DM imunomediado e outras síndromes genéticas associadas ao DM. O quarto tipo de DM se refere ao DM gestacional, que é definido como qualquer grau de intolerância à glicose com início ou primeiramente diagnosticado durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto (Masharani *et al.*, 2004; American Diabetes Association, 2005).

1.1.2. A epidemiologia do DM2

A frequência do DM2 vem aumentando de forma exponencial nas últimas décadas, adquirindo características de epidemia no mundo inteiro. No início da década de 1990, havia 100 milhões de pessoas no mundo com DM2. As estimativas indicam que este número deverá duplicar nos próximos 10 a 25 anos, principalmente nos países em desenvolvimento ou recentemente industrializados (Franco, 2004). Entre os fatores que explicariam esses dados estão o aumento das faixas populacionais mais idosas, como consequência da maior expectativa de vida da população, e as mudanças nos padrões alimentares e no estilo de vida (Franco, 2004).

A prevalência do DM2 apresenta uma ampla variação entre os diferentes grupos étnicos, sendo mais freqüente nos polinésios das Ilhas Nauru (40%), no Oceano Pacífico (DeFronzo, 2004), nos índios Pima do Arizona, nos EUA (51%), nos afro- (26%) e hispano-americanos (20%). Prevalências moderadas de DM2 são observadas na maioria dos países da América Latina e Caribe, onde a prevalência entre adultos é de 6 a 8% (Barceló e Rajpathak, 2001). Além disso, mesmo dentro de uma determinada área geográfica, a prevalência de DM2 é maior nas zonas urbanas comparadas às zonas rurais, que apresentam uma freqüência próxima a zero (Diamond, 2003).

De acordo com os dados obtidos pelo Estudo Multicêntrico sobre a Prevalência do Diabetes no Brasil, realizado em nove capitais brasileiras na década de 80, o DM apresenta uma prevalência de 7,6% na população com idade entre 30 e 69 anos. Os índices mais elevados foram encontrados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, que representam as regiões mais industrializadas do país. Em Porto Alegre (RS), as prevalências de DM e de intolerância à glicose foram de 8,9% e 12,2%, respectivamente (Franco, 2004).

Tanto homens quanto mulheres mostraram-se igualmente atingidos pela doença (7,4%) que, conforme o esperado, foi mais freqüente nos grupos populacionais com idade mais avançada, chegando a atingir no grupo mais idoso (60 a 69 anos) uma prevalência de 17%. No Brasil, ao contrário do observado em outros países, as populações caucasóide e negróide apresentaram freqüências semelhantes de DM (Franco, 2004), que foram 7,6% e 7,3%, respectivamente, o que pode ser explicado, ao menos em parte, pelo alto grau de miscigenação ocorrido entre esses dois diferentes grupos étnicos (Palatnik *et al.*, 2002).

1.2. As Complicações Crônicas do DM

As complicações micro- e macroangiopáticas são as causas mais comuns de morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos (Gray e Rudkin, 2004; Stehouwer e Schalkwijk, 2004), representando 80% dos casos (Bozza *et al.*, 2004).

Em relação às microangiopatias, os órgãos afetados são aqueles que não dependem de insulina para a absorção da glicose. De acordo com a intensidade e o tempo de exposição à hiperglicemia, ocorrem lesões estruturais no endotélio de pequenos vasos sanguíneos, provocando alterações funcionais de vários órgãos e tecidos. As principais características morfológicas são a constrição progressiva dos vasos sanguíneos, o espessamento da membrana basal dos capilares e o aumento da permeabilidade às proteínas plasmáticas (He e King, 2004). Clinicamente, os maiores problemas são: a retinopatia – DM é a causa não-traumática mais freqüente de cegueira (Dantas, 2004); a nefropatia – DM é a principal causa de falência e transplante renal (Gross *et al.*, 2005); e a neuropatia – DM é a principal causa de amputação dos membros inferiores em países em desenvolvimento (Nascimento, 2004).

A macroangiopatia diabética consiste, principalmente, de uma forma acelerada de aterosclerose que afeta as artérias coronarianas, cerebrovasculares e periféricas (Stehouwer e Schalkwijk, 2004). Os pacientes com DM apresentam taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares duas a cinco vezes maior do que indivíduos sem DM (Sobel, 2002; Raza e Movahed, 2003; Gray e Rudkin, 2004; Salles *et al.*, 2004). As principais manifestações clínicas da doença arterial coronariana (DAC) no DM são a angina estável, a angina instável, o infarto agudo do miocárdio (IAM), a insuficiência cardíaca e a morte súbita (Gray e Yudkin, 2004).

Os estudos epidemiológicos demonstram que houve um aumento exponencial na frequência de DAC nos países desenvolvidos, atingindo seu pico por volta de 1970, e desde então tem apresentado um constante declínio na população em geral (Grant, 2003; Raza e Movahed, 2003; Okrainec *et al.*, 2004). Entretanto, este declínio não vem ocorrendo entre os pacientes com DM (Grant, 2003; Raza e Movahed, 2003).

Inúmeros estudos têm constatado que os pacientes com DM2 tendem a apresentar uma agregação de múltiplos fatores de risco (Grant, 2003). Por ocasião do diagnóstico de DM2, aproximadamente 40% dos pacientes já sofrem de macroangiopatia, 40% apresentam nefropatia, 15% têm retinopatia, 50% são hipertensos e cerca de 50% têm hipertrigliceridemia (Beck-Nielsen e Groop, 1994). Essa agregação de anormalidades metabólicas revelou a existência de uma síndrome de resistência à insulina, também denominada de síndrome metabólica. A síndrome metabólica é definida pela presença de, pelo menos, três das seguintes características: obesidade abdominal, hipertrigliceridemia, reduzidos níveis de colesterol HDL, hipertensão e hiperglicemia (Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001).

A natureza familiar da síndrome metabólica tem sido enfatizada por estudos que demonstram a agregação das características desta síndrome em parentes em primeiro grau não diabéticos de pacientes com DM2 (Grant, 2003). Um estudo recente constatou que os pacientes diabéticos do tipo 2 com a síndrome metabólica apresentavam uma maior prevalência de retinopatia, nefropatia, neuropatia, DAC e doença vascular periférica do que os pacientes que não tinham esta síndrome. Além disso, quanto maior o número de características da síndrome metabólica presente em um determinado indivíduo, maior era a proporção de complicações micro- e macrovasculares (Costa *et al.*, 2004).

Embora os estudos referentes aos custos totais dispendidos com o DM na América Latina sejam escassos, estimativas revelam que o custo direto (serviços de prevenção, diagnóstico e tratamento) nos países da América Latina e Caribe é da ordem de US\$ 3 bilhões por ano (ou US\$ 353 por indivíduo). No Brasil, o custo total estimado é de aproximadamente US\$ 23 milhões anuais (o equivalente a US\$872 por paciente), sendo que 83% deste valor corresponde aos custos indiretos (dias de trabalho perdido, renda cessante pela morte prematura e outros) (Songer e Barcelo, 2004).

Os principais fatores que contribuíram para os custos diretos na América Latina, no ano de 2000, foram os gastos com os agentes antidiabéticos orais (US\$ 2,8 bilhões), seguido do tratamento das complicações (US\$ 2,5 bilhões), que representam 23% dos custos (Songer e Barcelo, 2004). Em relação às complicações do DM, os estudos revelam três tendências gerais. Primeiro, as complicações crônicas do DM em estágios avançados são mais dispendiosas do que o tratamento das complicações em estágio inicial, como por exemplo, o IAM (US\$ 28.000 por evento) e a doença renal crônica terminal (US\$ 54.000 por evento). Segundo, o custo é geralmente maior para os pacientes com complicações comparados aos diabéticos sem complicações. Terceiro, a complicação crônica mais dispendiosa é a nefropatia diabética (73%), seguida pela retinopatia diabética (11%) e pela doença cardiovascular (10%), na América Latina e Caribe (Songer e Barcelo, 2004).

1.2.1. A retinopatia diabética (RD)

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação vascular crônica do diabetes, que ocorre em uma fração significativa dos pacientes com DM1 e em mais de 50% dos pacientes com DM2. A RD se caracteriza por alterações gradualmente progressivas na microvasculatura da retina que, ao atingirem sua forma mais severa, podem resultar na perda irreversível da visão (Aiello *et al.*, 1998; Fong *et al.*, 2003). Estima-se que a perda de visão é 25 vezes mais freqüente em pessoas com DM do que em indivíduos sem essa doença (Aiello *et al.*, 1998). A RD se constitui na principal causa não-traumática de novos casos de cegueira em adultos de 20 a 74 anos de idade (Ciulla *et al.*, 2003; Fong *et al.*, 2003).

O capilar retiniano é formado pelas células endoteliais, pelas células intramurais (ou pericitos) e pela membrana basal (Agardh e Agardh, 2004; Dantas, 2004). A vasculatura retiniana é dependente de mecanismos locais para a regulação do fluxo sanguíneo. No DM, os mecanismos de auto-regulação estão alterados (Agardh e Agardh, 2004).

Na etapa inicial da RD, ocorre a degeneração seletiva dos pericitos e o espessamento da membrana basal, resultando na formação de capilares acelulares e no enfraquecimento da parede vascular. Conseqüentemente, as células endoteliais proliferam-se, levando à formação de capilares dilatados (microaneurismas). Com o subsequente desequilíbrio na auto-regulação do fluxo sanguíneo, ocorre um aumento da pressão hidrostática nos capilares retinianos, levando ao rompimento da barreira hematorretiniana. Com isso, aumenta a permeabilidade vascular, que resulta em hemorragias retinianas e no acúmulo extracelular de fluidos, lipídios e lipoproteínas (que são clinicamente denominados de exsudatos duros). A oclusão dos capilares, causada pelo espessamento da membrana basal,

pela agregação plaquetária, pela ativação de leucócitos e/ou migração das células gliais através das paredes vasculares, resulta em áreas de não-perfusão e hipóxia, com a subsequente dilatação dos capilares pré-existentes ou formação de vasos em “forma de colar”. A oclusão dos capilares também resulta em anormalidades microvasculares intraretinianas (IRMA) e no extravasamento generalizado de fluidos. As áreas de não-perfusão estimulam o crescimento de novos vasos que se formam na superfície da retina, no disco óptico ou em outras regiões. Por serem anômalos e frágeis, estes neovasos são propensos a extensas hemorragias. A neovascularização pode permanecer estável e sofrer regressão espontânea, ao passo que, em alguns casos, ocorre uma rápida progressão que confere um elevado risco para a subsequente perda visual. Além disso, o tecido conjuntivo que se forma ao redor dos neovasos pode contrair, levando à tração e ao descolamento da retina. Desta forma, as hemorragias, o descolamento da retina e o tecido fibroso residual contribuem para a perda irreversível da visão (Agardh e Agardh, 2004).

Além disso, em qualquer estágio da RD, os pacientes com DM podem também desenvolver edema macular, que envolve o espessamento da retina na região macular. O edema ocorre após o rompimento da barreira hematorretiniana como consequência do extravasamento de fluidos dos capilares e microaneurismas (Ciulla *et al.*, 2003).

Existem várias classificações propostas para definir os diferentes estágios da RD, baseadas na severidade das alterações na vasculatura retiniana (Agardh e Agardh, 2004; Dantas, 2004). Para o propósito do presente estudo, optamos pela classificação mais simples e comumente utilizada na literatura. Assim, a RD foi classificada em três categorias: ausente, não-proliferativa (presença de microaneurismas, hemorragias retinianas, edema retiniano e exsudatos duros) e proliferativa (neovascularização no disco óptico ou em outras regiões) (Ciulla *et al.*, 2003; Dantas, 2004).

Inúmeros estudos epidemiológicos têm demonstrado que a hiperglicemia e o tempo de duração do DM são os principais fatores de risco para o desenvolvimento e a progressão da RD (Stratton *et al.*, 2001; Agardh e Agardh, 2004; Santos *et al.*, 2005). Outros fatores, tais como a hipertensão, a hipercolesterolemia e o tabagismo também têm sido implicados na patogênese desta complicação (Fong *et al.*, 2003; Agardh e Agardh, 2004).

Um estudo recente em pacientes com DM2 atendidos nos ambulatórios de três centros médicos do Estado do Rio Grande do Sul observou que a frequência de RD foi de 48%, dos quais 15% apresentavam RD proliferativa. Além disso, a RD estava presente em uma proporção considerável de pacientes com tempo de DM inferior a 5 anos (27%) (Scheffel *et al.*, 2004).

1.2.2. A nefropatia diabética (ND)

A nefropatia diabética (ND) é a principal causa de doença renal crônica terminal e de transplante renal nos Estados Unidos e na Europa (American Diabetes Association, 2004; Gouvêa, 2004). No Brasil, foi constatado que 26% dos pacientes que ingressam em programas de diálise são diabéticos (Bruno e Gross, 2000).

O desenvolvimento da ND se deve à ação sinérgica dos danos na estrutura glomerular e das anormalidades hemodinâmicas que resultam na esclerose glomerular e conseqüente perda da filtração glomerular. Classificadamente, a ND é classificada em cinco estágios, durante os quais ocorre o gradual comprometimento glomerular, com o conseqüente aumento do grau de proteinúria (macroalbuminúria), o aumento da pressão arterial sistêmica e o declínio da taxa de filtração glomerular (Gouvêa, 2004).

Clinicamente o diagnóstico de ND baseia-se na presença de proteinúria $> 0,5\text{g}/24\text{h}$ (Gross *et al.*, 2005). Como a albumina é a principal proteína excretada na ND (Jones *et al.*, 2004), a primeira evidência clínica de ND é a ocorrência de níveis anormais de albumina na urina (American Diabetes Association, 2004). A taxa normal de excreção de albumina é de até $30\text{ mg}/24\text{h}$ ($\leq 20\text{ }\mu\text{g}/\text{min}$ ou $\leq 30\text{ mg}/\text{g}$ creatinina), enquanto valores entre 30 a $299\text{ mg}/24\text{h}$ são definidos como microalbuminúria ($20\text{-}199\text{ }\mu\text{g}/\text{min}$ ou $30\text{-}299\text{ mg}/\text{g}$ creatinina), e aqueles iguais ou superiores a $300\text{ mg}/24\text{h}$ são definidos como macroalbuminúria ($\geq 200\text{ }\mu\text{g}/\text{min}$ ou $\geq 300\text{ mg}/\text{g}$ creatinina) (American Diabetes Association, 2004; Gross *et al.*, 2005). A ND pode ainda ser classificada em nefropatia incipiente, definida pela microalbuminúria persistente ou nefropatia clínica, definida pela macroalbuminúria persistente (American Diabetes Association, 2004; Jones *et al.*, 2004).

Atualmente, três métodos são aceitos para o rastreamento da microalbuminúria: (1) a medida da razão albumina/creatinina numa amostra de urina casual (isto é, coletada aleatoriamente sem um horário pré-estabelecido); (2) a quantificação da microalbuminúria num volume de urina coletado em um período de 24 horas; e (3) a coleta minutada (por exemplo, durante um período de 4 horas ou durante a noite) (American Diabetes Association, 2004). Embora a medida da taxa de excreção de albumina na urina seja a base para o diagnóstico de ND, existem pacientes diabéticos que apresentam um declínio na taxa de filtração glomerular na presença de normoalbuminúria (Gross *et al.*, 2005).

A principal função dos rins é a manutenção da homeostasia do meio extracelular. A unidade funcional do rim é o néfron, constituído de um glomérulo, onde o ultrafiltrado plasmático é formado, e de um túbulo, onde ele é manipulado e a urina tem origem (Gouvêa, 2004).

No estágio inicial do DM, devido à hipertrofia glomerular e tubular, ocorre o aumento do volume dos rins, que permanecem hiperfuncionantes durante anos. Com o passar do tempo, ocorre o espessamento da membrana basal glomerular, a redução do número de podócitos e o prolongamento dos podócitos remanescentes para cobrir a área da membrana basal exposta. Em conjunto, esses fenômenos são responsáveis pela perda da permeabilidade seletiva do glomérulo, o que por sua vez ocasiona um aumento no transporte de proteínas (principalmente albumina) para a cápsula de Bowmann. Por fim, ocorre a expansão da matriz mesangial e a obsolescência glomerular (esclerose global) decorrentes do processo de dano glomerular (Gouvêa, 2004; Jones *et al.*, 2004).

Em relação às células tubulares, ocorre a hipertrofia destas células bem como o espessamento da membrana basal tubular. Nos estágios mais avançados da ND pode-se identificar a atrofia tubular e a fibrose tubulointersticial, que se correlacionam com o nível de filtração glomerular e com o grau de expansão mesangial e de esclerose glomerular. Quando os níveis de pressão arterial são elevados, ocorre a hialinose vascular que afeta as arteríolas aferentes e eferentes, podendo danificar o aparelho justaglomerular (Gouvêa, 2004; Jones *et al.*, 2004).

O fenômeno hemodinâmico que caracteriza a ND é a perda da capacidade de autorregulação do fluxo sanguíneo renal e da filtração glomerular, decorrente dos danos estruturais sofridos pelas arteríolas aferentes e eferentes, que são as estruturas vasculares responsáveis por essa regulação. Também ocorre o aumento do fluxo sanguíneo renal e da filtração glomerular. O aumento da pressão do capilar glomerular, com a conseqüente hiperfiltração, é a principal alteração hemodinâmica da ND. Ele se deve ao relaxamento da arteríola aferente em associação à vasoconstrição relativa da arteríola eferente, permitindo

um aumento do fluxo sanguíneo glomerular e da pressão da filtração no capilar glomerular. O impacto dessas forças físicas elevadas sobre a delicada estrutura da barreira de filtração glomerular alterada ocasiona a sua progressiva deterioração e contribui significativamente para a progressão da doença renal (Gouvêa, 2004).

Entre os principais fatores de risco para a ND estão a hiperglicemia, o tempo de duração do DM e a hipertensão. Outros fatores que também podem estar envolvidos no desenvolvimento desta complicação incluem a dislipidemia, o tabagismo e os fatores nutricionais, tais como a quantidade e a origem da proteína da dieta (Gross *et al.*, 2005).

Os estudos populacionais demonstram que a prevalência e a incidência de ND variam consideravelmente dependendo do critério de seleção da população de estudo, do grupo étnico e de fatores técnicos relacionados ao tipo de método utilizado para o diagnóstico da microalbuminúria (Jones *et al.*, 2004). Nos pacientes com diagnóstico prévio de DM2, a prevalência de microalbuminúria varia de 10 a 42%, enquanto a macroalbuminúria está presente em 5 a 33% (Jones *et al.*, 2004). No Brasil, Scheffel e colaboradores (2004) constataram que 37% dos pacientes com DM2 apresentavam doença renal, dos quais 12% eram macroalbuminúricos.

Embora a microalbuminúria seja considerada um importante fator de risco para a macroalbuminúria, nem todos os pacientes evoluem para este estágio, e uma proporção destes pacientes podem regredir para a normoalbuminúria (Gross *et al.*, 2005). No DM2, cerca de 20 a 40% dos pacientes com microalbuminúria progridem para a nefropatia clínica, e entre estes, aproximadamente 20% desenvolvem falência renal crônica terminal (American Diabetes Association, 2004).

Além de caracterizar o estágio inicial da ND, a presença de microalbuminúria está associada à ocorrência de doenças cardiovasculares e à mortalidade prematura observadas nos pacientes com DM2 (Gray e Yudkin, 2004; Jones *et al.*, 2004; Bo *et al.*, 2005). Esse aumento da mortalidade pode ser explicado pela associação da microalbuminúria com a hipertensão, a dislipidemia e as alterações da função endotelial e dos fatores de coagulação (Gray e Yudkin, 2004; Jones *et al.*, 2004). Alguns estudos observaram que os parentes em primeiro grau de pacientes com DM2 apresentam uma freqüência maior de hipertensão, dislipidemia e doença cardiovascular do que os parentes de pacientes diabéticos com excreção de albumina normal (Jones *et al.*, 2004).

Além disso, existem fortes evidências de que um aumento nos níveis de albumina urinária, mesmo que dentro da variação normal, está associado à ocorrência de ND e doença cardiovascular (Gross *et al.*, 2005). Assim, a microalbuminúria parece refletir um estado generalizado de disfunção endotelial (Endemann e Schiffrin, 2004; Gray e Yudkin, 2004; Jones *et al.*, 2004).

1.2.3. A cardiopatia isquêmica (CI)

A cardiopatia isquêmica (CI) é uma doença decorrente da redução ou interrupção do fluxo sanguíneo coronariano. Como a CI geralmente resulta de uma obstrução parcial ou total das artérias coronarianas causada pela presença de placas de ateroma, ela também é referida como sinônimo de doença arterial coronariana (DAC) (Stocker e Keaney Jr., 2004).

A parede arterial é composta por três camadas concêntricas que envolvem o lúmen arterial (a íntima, a média e a adventícia). A íntima é a camada adjacente ao lúmen, com as células endoteliais entrepostas entre a íntima e o lúmen. A média é a camada responsável pela contração e dilatação das artérias, e a adventícia, a mais distante do lúmen (Stocker e Keaney Jr., 2004).

A aterosclerose afeta principalmente a camada íntima das artérias e caracteriza-se basicamente pelo espessamento, endurecimento e perda de elasticidade da parede arterial, decorrentes do excesso de proliferação celular, acúmulo de gordura, inflamação e calcificação. Com isso, ocorre o estreitamento gradual da luz do vaso com a conseqüente redução no fluxo sanguíneo (Szklo e Nieto, 1999). O processo aterosclerótico geralmente tem início na infância, permanecendo assintomático até que danos significativos se desenvolvam na idade adulta (Szklo e Nieto, 1999).

Os estudos clínicos em humanos bem como os estudos experimentais em modelos animais têm caracterizado os eventos da aterosclerose (Lusis *et al.*, 2004; Stocker e Keaney Jr., 2004). A formação da placa aterosclerótica tem início quando as células endoteliais, ativadas por diversos fatores, expressam moléculas quimioatraentes e de adesão que, por sua vez, recrutam células inflamatórias da circulação, tais como os monócitos e os linfócitos T. Nesta fase, o endotélio torna-se permeável, facilitando a passagem de lipídios circulantes para a íntima. Nesta camada, formam-se depósitos de gordura (estrias gordurosas), que sofrem oxidação e acetilação. Os monócitos recrutados para a parede arterial sofrem diferenciação e se transformam em macrófagos, passando a expressar receptores “scavenger” que reconhecem e internalizam as lipoproteínas modificadas. Estes macrófagos não possuem a capacidade de metabolizar os lipídios modificados, que se acumulam intracelularmente, levando à formação das células

espumosas. As células espumosas bem como os leucócitos secretam citocinas e fatores de crescimento que amplificam o recrutamento dos leucócitos e provocam a migração e proliferação de células do músculo liso. Estas células sintetizam uma matriz de colágeno formando uma capa fibrosa que envolve e protege um núcleo rico em lipídios e debris celulares decorrentes da necrose das células espumosas. À medida que a lesão progride, mediadores inflamatórios aumentam a expressão de procoagulantes e de metaloproteinases de matriz que enfraquecem a capa fibrosa, podendo levar a sua ruptura (Tracy, 2004).

A placa estável caracteriza-se por uma capa fibrosa espessa, consistindo de células do músculo liso e colágeno, ao passo que a placa instável possui uma capa fibrosa fina e é rica em células inflamatórias e lipídios. Caso haja uma ruptura da capa fibrosa, o núcleo necrótico (rico em lipídios e colágeno) entra em contato com o sangue, estimulando a ativação plaquetária e a coagulação sangüínea que, por sua vez, culminam na formação do trombo. Se houver um desequilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise, pode ocorrer a expansão da lesão e a obstrução parcial ou total da luz arterial. Além deste mecanismo, o trombo pode também se originar da erosão superficial da placa vulnerável. Assim, o bloqueio do fluxo sangüíneo desencadeia a DAC, que pode se manifestar de diferentes formas, como mencionado anteriormente (Skrha, 2003; Gray e Yudkin, 2004; Stocker e Keaney Jr., 2004).

As lesões ateroscleróticas (placas ou ateromas) podem ser divididas em seis fases, de acordo com o estágio das alterações morfológicas: os tipos I, II e III (pré-ateroma) caracterizam-se pela presença de células espumosas e estrias gordurosas; o tipo IV (ateroma), por um depósito lipídico único; o tipo V (fibroateroma), por um grande depósito de lipídios, colágeno e células musculares lisas e o tipo VI (lesão complicada), pela

possibilidade de erosão ou fissura e a conseqüente hemorragia/trombo (Stocker e Keaney Jr., 2004).

Embora a lesão aterosclerótica no DM seja histologicamente similar a que ocorre em indivíduos sem DM, vários estudos têm demonstrado que a aterosclerose se manifesta de forma mais extensa e severa, bem como progride mais rapidamente em pacientes com DM (Moreno *et al.*, 2000; Otel *et al.*, 2003; Raza e Movahed, 2003; Gray e Rudkin, 2004). Além disso, a DAC pode estar associada com uma disfunção endotelial generalizada e com anormalidades da microcirculação em pacientes diabéticos (American Diabetes Association, 1998).

Clinicamente a angina caracteriza-se por uma crise ou dor pré-cordial intensa e súbita causada por uma isquemia miocárdica transitória e de curta duração, decorrente do bloqueio parcial das artérias coronarianas. A angina estável (típica) é uma manifestação freqüente da DAC nos pacientes com DM e é geralmente desencadeada por esforço físico ou estresse emocional. A angina instável (atípica) é caracterizada por palpitações indolores, repetidas e prolongadas, que ocorrem em repouso ou sob esforço físico mínimo (Strojek, 2003; Gray e Yudkin, 2004).

A isquemia miocárdica silenciosa ocorre mais freqüentemente em pacientes diabéticos (Otel *et al.*, 2003). Sua prevalência varia de 10 a 20% em indivíduos diabéticos, enquanto em indivíduos sem DM a freqüência varia de 1 a 4% (Raza e Movahed, 2003; Gray e Rudkin, 2004). Tem sido proposto que a ausência de dor isquêmica no DM pode ser decorrente dos diferentes padrões de sensibilidade à dor ou da presença de neuropatia diabética (Beck *et al.*, 1999; Gray e Rudkin, 2004). Alguns estudos têm sugerido que a isquemia miocárdica silenciosa reflete a presença de aterosclerose coronariana avançada (Gray e Rudkin, 2004; Wackers *et al.*, 2004).

O infarto agudo do miocárdio (IAM) manifesta-se através de isquemia intensa e duradoura, resultando na necrose do músculo cardíaco causado pela formação de trombos a partir do rompimento de uma placa aterosclerótica pré-existente. Os sintomas de IAM no DM são clássicos, sendo a dor no peito a característica predominante. Contudo, IAM assintomático é mais freqüente em indivíduos com DM do que em indivíduos sem esta doença. Em pacientes diabéticos, a elevada taxa de mortalidade associada ao IAM deve-se principalmente à insuficiência cardíaca e ao choque cardiogênico (Gray e Yudkin, 2004). O diagnóstico de IAM baseia-se nos sintomas clínicos, nas alterações no eletrocardiograma e na dosagem sérica de enzimas cardíacas. Atualmente, recomenda-se também a dosagem de troponina, que é específica para o dano cardíaco (Gray e Yudkin, 2004).

A insuficiência cardíaca é uma manifestação freqüente da DAC no DM. A causa mais comum é a cardiopatia isquêmica, mas anormalidades na função ventricular podem ocorrer de forma assintomática em pacientes com DM mesmo na ausência de anormalidades cardíacas estruturais. Este fenômeno está correlacionado com o tempo de duração do DM e com a presença das complicações microvasculares, sugerindo a existência de uma cardiomiopatia diabética (Sobel, 2002; Strojek, 2003; Gray e Yudkin, 2004). Os prováveis mecanismos da cardiomiopatia incluem as disfunções no metabolismo energético do miocárdio e as alterações bioquímicas decorrentes da hiperglicemia crônica (Sobel, 2002).

A morte súbita, geralmente definida como ocorrência de morte até uma hora após o início dos sintomas, é uma manifestação reconhecida da DAC. Existem evidências empíricas de que a ocorrência de neuropatia diabética (que afeta o sistema condutor) aumenta a propensão para a morte súbita no DM (Gray e Yudkin, 2004).

Os estudos populacionais demonstram que os principais fatores de risco para a doença cardiovascular aplicam-se tanto aos pacientes com DM quanto aos indivíduos sem DM, que são: idade, tabagismo, hipertensão, dislipidemia, obesidade (especialmente a obesidade abdominal), sedentarismo, hipercoagulabilidade, hiperhomocisteinemia, nefropatia e resistência à insulina (Sobel, 2002; Gray e Rudkin, 2004; Stehouwer e Schalkwijk, 2004; Stocker e Keaney Jr., 2004).

No entanto, o risco conferido por cada um desses fatores é aumentado na presença de DM, o que sugere que a presença de DM é um fator de risco independente para a doença cardiovascular (Bozza *et al.*, 2004; Gray e Rudkin, 2004). O estudo multicêntrico “United Kingdom Prospective Diabetes Study” (UKPDS), realizado no Reino Unido, mostrou que para a redução de 1% nos níveis de glicohemoglobina havia uma redução correspondente de 14% no risco de mortalidade por IAM (Bozza *et al.*, 2004). No Rio Grande do Sul, observou-se que a prevalência de cardiopatia isquêmica é de 36% em pacientes com DM2 (Scheffel *et al.*, 2004).

1.3. A Patogênese das Complicações Crônicas do DM

A fisiopatologia celular e molecular das complicações vasculares do DM ainda não foram completamente elucidadas. Porém, os estudos clínicos e experimentais têm proposto que a hiperglicemia promove o desenvolvimento da angiopatia diabética por meio da ativação e aceleração de diferentes rotas bioquímicas que culminam na disfunção endotelial (Skrha, 2003; Agardh e Agardh, 2004; Gouvêa, 2004; He e King, 2004).

Os estudos em humanos e em modelos animais demonstram que a disfunção endotelial exerce um papel fundamental na patogênese da micro- e da macroangiopatia no DM, contribuindo não somente para o seu estágio inicial, como também para a sua progressão e desfechos clínicos (De Vriese *et al.*, 2000; Bayraktutan, 2002; Endemann e Schiffrin, 2004; Li e Shah, 2004; Stehouwer e Schalkwijk, 2004; Wassmann *et al.*, 2004).

O desenvolvimento da angiopatia diabética envolve alterações funcionais e estruturais na vasculatura. A disfunção endotelial é seguida por modificações morfológicas na parede vascular que levam à falência do órgão em um estágio mais avançado (Skrha, 2003).

1.3.1. A disfunção endotelial

O endotélio é um órgão multifuncional composto por uma camada contígua de células que revestem a superfície interna de todos os vasos sanguíneos, formando uma barreira física entre o sangue circulante e a parede vascular. Sob condições fisiológicas, o endotélio atua ativamente como um regulador da homeostasia e da integridade vascular (Bayraktutan, 2002; Wheatcroft *et al.*, 2003; Li e Shah, 2004; Stocker e Keaney Jr., 2004).

Em condições fisiológicas, o endotélio produz uma grande diversidade de substâncias que regulam o tônus e a permeabilidade vascular, modulam as respostas imunes e inflamatórias, inibem a proliferação das células do músculo liso vascular, inibem a adesão e a migração de leucócitos, inibem a adesão e a agregação plaquetárias, inibem a oxidação do colesterol LDL e regulam a pressão sanguínea e a hemostasia (Bayraktutan, 2002; Stehouwer e Schalkwijk, 2004). O endotélio tanto modula quanto pode ser afetado pelas funções de outros tipos celulares, tais como as plaquetas, os leucócitos, os pericitos

retinianos, as células mesangiais renais e os macrófagos das grandes artérias (Stehouwer e Schalkwijk, 2004).

Porém, em resposta aos fatores hormonais e hemodinâmicos, bem como na presença de fatores aterotrombóticos, o endotélio perde suas funções anti-inflamatória, anti-proliferativa, anti-trombogênica e vasodilatadora, levando à disfunção de um determinado órgão. A perda da manutenção da função normal do órgão, tanto em estado basal quanto em resposta aos estímulos físicos ou químicos define a disfunção endotelial (Bayraktutan, 2002).

Vários estudos familiares e populacionais revelaram que a disfunção endotelial pode preceder o desenvolvimento da resistência à insulina e do DM2, e pode também preceder a manifestação clínica da micro- e macroangiopatia (Tooke e Goh, 1999; Raza e Movahed, 2003; Endemann e Schiffrin, 2004). Os indivíduos com tolerância à glicose diminuída (IGT) também apresentam uma evidente disfunção na vasodilatação microvascular (Tooke e Goh, 1999; Singleton *et al.*, 2003) e apresentam um risco maior de desenvolver as complicações crônicas do DM (Singleton *et al.*, 2003). Estas observações levaram à proposta de que existiria uma endoteliopatia intrínseca ao DM e à resistência à insulina (Tooke e Goh, 1999).

Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento dos processos inflamatórios na patogênese da resistência à insulina, diabetes e doença cardiovascular. Segundo a hipótese do denominador comum (“common soil”), fatores ambientais adversos (tais como o sedentarismo, o tabagismo e o consumo de dietas ricas em gordura) geram respostas pró-inflamatórias nos adipócitos e outros tipos celulares, provocando a liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, que levam ao desenvolvimento de resistência à insulina, DM2 e doença cardiovascular (Grant, 2003; Tracy, 2004).

Além disso, há autores que sugerem que a inflamação crônica estaria associada à ocorrência e à progressão da microalbuminúria e da doença aterotrombótica, independentemente da presença de DM. A inflamação poderia ser tanto a causa como a consequência da disfunção endotelial (Stehouwer e Schalkwijk, 2004). No entanto, vários autores propõem o mecanismo inverso, no qual a resistência à insulina e a hiperglicemia seriam a causa primária da disfunção endotelial (Wheatcroft *et al.*, 2003).

Como as células endoteliais de diferentes tecidos apresentam diferenças metabólicas e estruturais, elas podem ser diferencialmente afetadas pela hiperglicemia. Os mecanismos que levam à disfunção endotelial podem diferir de acordo com o modelo de DM, o tamanho do vaso sanguíneo e a sua localização anatômica (De Vriese *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2004; Stehouwer e Schalkwijk, 2004).

A patofisiologia da disfunção endotelial é complexa e envolve múltiplos mecanismos, interconectados e que atuam sinergisticamente (Endemann e Schiffrin, 2004; Stehouwer e Schalkwijk, 2004). Porém, pode-se dizer que a disfunção endotelial no DM origina-se de três fontes principais. Primeiro, a hiperglicemia e suas consequências bioquímicas imediatas alteram diretamente a função endotelial, por estimular as células endoteliais a aumentar a produção de componentes da matriz extracelular e de proteínas procoagulantes. O DM é reconhecido como um estado hipercoagulável com maior agregação plaquetária, reduzida capacidade fibrinolítica e maior concentração de proteínas hemostáticas (Gray e Rudkin, 2004; Stehouwer e Schalkwijk, 2004). Segundo, a hiperglicemia influencia a função endotelial indiretamente pela síntese de fatores de crescimento, citocinas e agentes vasoativos em outras células. Terceiro, os componentes da síndrome metabólica podem prejudicar a função endotelial (Stehouwer e Schalkwijk, 2004).

Independentemente da endoteliopatia ser causa ou consequência da hiperglicemia, os eventos que levam à disfunção endotelial são mediados pelos seguintes mecanismos: geração de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo), ativação da via do poliol (sorbitol), formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) e ativação da proteína cinase C (PKC) (Skrha, 2003; Agardh e Agardh, 2004; Gouvêa, 2004; He e King, 2004).

1.3.2. O estresse oxidativo

Os radicais livres são átomos ou moléculas que têm um ou mais elétrons não pareados em seus orbitais, o que lhes confere alta reatividade. O termo "espécies reativas de oxigênio" (EROs) incluem os radicais de oxigênio, tais como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e a hidroxila (OH^{\cdot}), e os pró-oxidantes, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ozônio. Existem ainda as "espécies reativas de nitrogênio" (ERNs), que incluem o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e seu derivado peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (Halliwell e Gutteridge, 1999; Dröge, 2002; Li e Shah, 2004).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são continuamente geradas em condições fisiológicas e efetivamente eliminadas por vários sistemas de defesa antioxidantes intra- e extracelulares. Três enzimas principais estão envolvidas neste mecanismo de defesa, que são as superóxidos dismutases (SODs) dependentes de Cu/Zn e Mn (SOD Cu/Zn, SOD Mn), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPX). Além dessas enzimas, existem outros antioxidantes, como a glutatona, a ceruloplasmina e as vitaminas C e E, entre outros (Dröge, 2002; Fang *et al.*, 2002; Li e Shah, 2004; Wassmann *et al.*, 2004).

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), produzido por diferentes oxidases, ou gerado como um subproduto do metabolismo mitocondrial, é convertido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular ($H_2O_2 + O_2$) pelas SODs. Na presença de metais de transição, o H_2O_2 pode ser convertido no radical hidroxila, que também é altamente reativo e citotóxico para as células. Alternativamente, o H_2O_2 pode ser convertido em água ($H_2O + O_2$) pela CAT ou pela GPX. A GPX, por sua vez, também atua na remoção de outros tipos de peróxidos (Halliwell e Gutteridge, 1999; Wolin, 2000; Dröge, 2002).

Os eritrócitos são células altamente especializadas, cuja função principal é o transporte de oxigênio e de dióxido de carbono. Essas células possuem um sistema de defesa antioxidante muito eficiente, apresentando elevados níveis de enzimas antioxidantes e de glutathione. Assim, os eritrócitos atuam como seqüestradores móveis de radicais livres, fornecendo proteção antioxidante a vários órgãos e tecidos (Siems *et al.*, 2000).

Em concentrações moderadas, os radicais livres e seus derivados atuam como mensageiros secundários no controle de uma variedade de respostas fisiológicas, tais como: regulação do tônus vascular, monitoramento da concentração de oxigênio no controle da ventilação, regulação da produção de eritropoietina, amplificação da transdução de sinal emitido pelos receptores de membrana relacionados com a resposta imune e manutenção do balanço redox intracelular (Wolin, 2000; Dröge, 2002; Li e Shah, 2004).

Sob condições fisiológicas, as EROs são geradas por enzimas estritamente reguladas, como a óxido nítrico sintetase endotelial (ver item 1.4.5) e a NAD(P)H oxidase vascular (ver item 1.4.7), por exemplo. Os radicais livres mais importantes para a fisiologia celular são o ânion superóxido e o óxido nítrico (Cai e Harrison, 2000; Dröge, 2002; Li e Shah, 2004).

As células e os tecidos estão em equilíbrio redox se as taxas de produção e inativação das EROs são constantes e balanceadas. Contudo, quando ocorre um aumento na geração de EROs que excede a capacidade de defesa celular, tais elementos instáveis interagem com macromoléculas essenciais (lipídios, proteínas e DNA), provocando alterações histológicas e anormalidades funcionais. O deslocamento do equilíbrio entre as atividades pró- e antioxidante, em favor da primeira, é definido como estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1999), sendo que a susceptibilidade de um determinado órgão ao estresse oxidativo é uma função do equilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e os diferentes sistemas de defesa celular antioxidante.

Assim, o dano oxidativo pode resultar de um aumento na produção de radicais livres, de uma insuficiência no potencial antioxidante, ou ambos. O estresse pode ser amplificado e propagado por uma cascata metabólica, que resulta em alterações tissulares e na morte celular, levando a um aumento simultâneo na produção de radicais livres e inibição dos mecanismos neutralizadores desses radicais (Halliwell e Gutteridge, 1999; Dröge, 2002).

A oxidação não-enzimática de moléculas, membranas celulares e tecidos mediada por radicais livres está associada à ocorrência de uma variedade de eventos patológicos, tais como o DM, a aterosclerose e o câncer (De Vriese *et al.*, 2000; West, 2000; Dröge, 2002). O estresse oxidativo causado pela hiperglicemia leva ao aumento da expressão gênica de enzimas antioxidantes nas células vasculares (Dröge, 2002; Skrha, 2003).

Diversos estudos têm sugerido que polimorfismos em genes codificadores de proteínas envolvidas no estresse oxidativo podem contribuir para a predisposição diferencial ao desenvolvimento das complicações crônicas do DM (Forsberg *et al.*, 2001a; Whitehead e FitzGerald, 2001; Skrha, 2003).

1.3.3. A disfunção endotelial e o estresse oxidativo

O estresse oxidativo é reconhecido como a principal causa do desenvolvimento da disfunção endotelial observada nas complicações crônicas do DM (Skhra, 2003). O processo de disfunção endotelial se inicia quando a hiperglicemia e outros fatores de risco metabólicos ativam múltiplas vias bioquímicas que convergem para aumentar a produção de EROs e o estresse oxidativo na vasculatura (Cai e Harrison, 2000; Bayraktutan, 2002; Loscalzo, 2003).

Em modelos animais, o estresse oxidativo leva à disfunção endotelial e está correlacionado ao grau de disfunção da vasodilatação dependente do endotélio, à resistência à insulina e a outros eventos cardiovasculares (Evans *et al.*, 2002; Wheatcroft *et al.*, 2003; Endemann e Schiffrin, 2004). Os estudos experimentais têm mostrado que a inibição das rotas mediadas pelo estresse oxidativo melhora a função endotelial em humanos e em animais (Yokoyama, 2004), e que o tratamento com vitaminas antioxidantes recupera a função endotelial em pacientes com doença renal crônica terminal (Endemann e Schiffrin, 2004). Porém, os ensaios clínicos com o uso de antioxidantes em pacientes com doenças cardíacas têm demonstrado resultados conflitantes (Yokoyama, 2004).

Como demonstrado na figura 1, os potenciais mecanismos que levam ao aumento do estresse oxidativo são:

(1) o aumento na produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pela fosforilação oxidativa mitocondrial;

(2) o aumento na geração de EROs (principalmente do $O_2^{\cdot-}$) pelas isoformas endoteliais da óxido nítrico sintetase (eNOS), da NAD(P)H oxidase e de outras enzimas;

(3) a menor biodisponibilidade do vasodilatador óxido nítrico (devido à redução na expressão/atividade da eNOS, à deficiência de substrato ou cofatores da eNOS e/ou à degradação do óxido nítrico pelas EROs);

(4) a menor expressão ou atividade das enzimas antioxidantes;

(5) os níveis reduzidos de glutathione, vitaminas e outros antioxidantes;

(6) a aceleração de vias bioquímicas como consequência direta da hiperglicemia: maior auto-oxidação da glicose, formação dos AGEs (ver item 1.4.3), ativação da via da PKC e aceleração da via do poliol (ver item 1.4.4).

Além dos efeitos diretos nas membranas celulares, nas proteínas e no DNA, e da menor biodisponibilidade de óxido nítrico (Li e Shah, 2004), os níveis elevados de EROs produzidos a partir dos mecanismos acima mencionados induzem a ativação de fatores de transcrição redox-sensíveis (Kunsch e Medford, 1999), levando à expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, moléculas de adesão, proteínas de matriz extracelular, receptores de LDL oxidado e proteínas reguladoras do ciclo celular (Wassmann *et al.*, 2004).

Essa amplitude de alterações metabólicas perturba a função normal do endotélio que responde por meio da síntese de fatores de coagulação, moléculas de adesão, citocinas, vasoconstritores e fatores moduladores da angiogênese, gerando vasoconstrição, agregação plaquetária, crescimento das células do músculo liso vascular, remodelamento da matriz extracelular, inflamação e apoptose das células endoteliais (Cai e Harrison, 2000; Skhra, 2003; Stehouwer e Schalkwijk, 2004). Estes eventos, por sua vez, propagam a cascata de reações que geram as EROs, amplificando ainda mais o estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1999; Dröge, 2002).

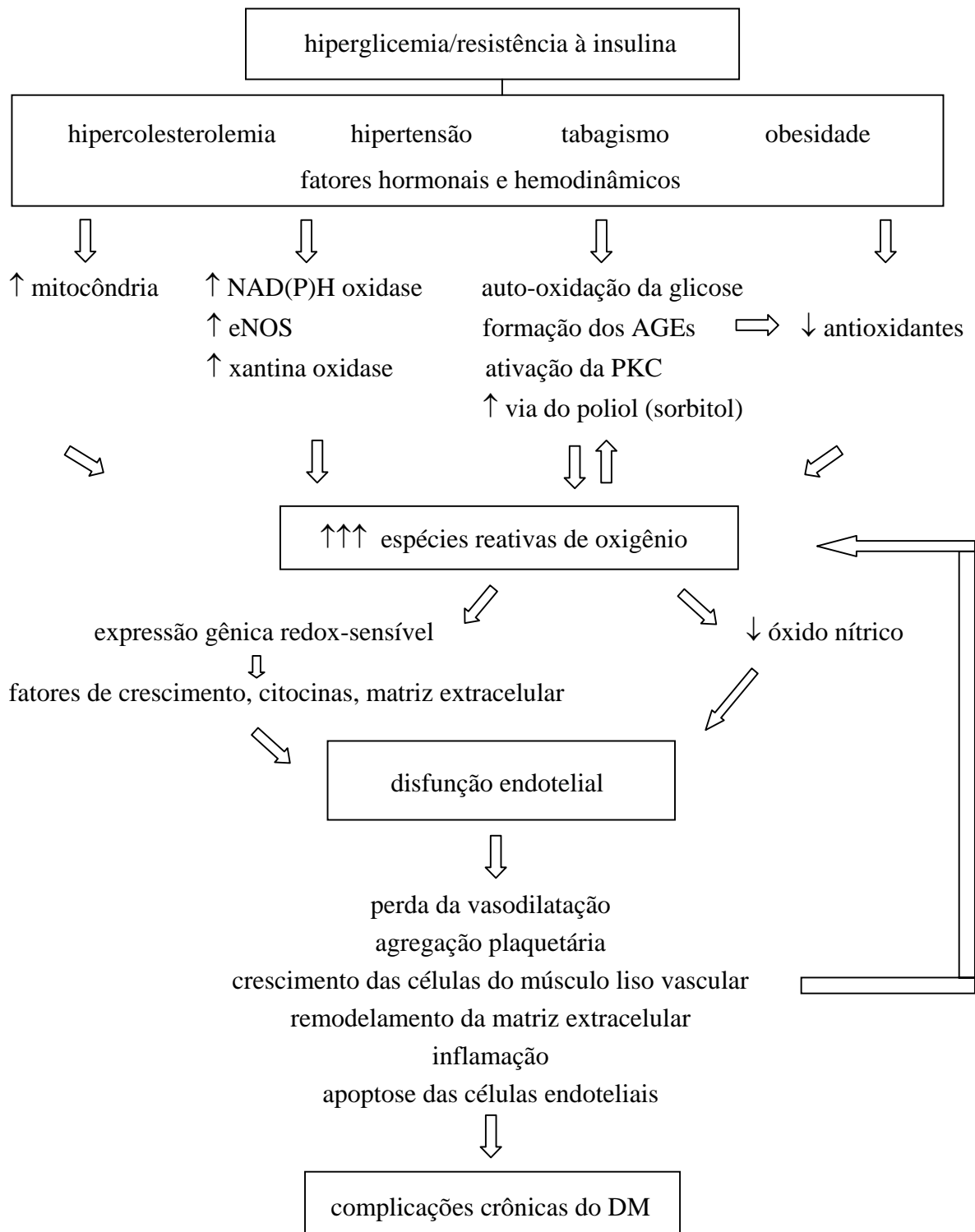


Figura 1. Esquema simplificado demonstrando os mecanismos pelos quais a hiperglicemia e outros fatores de risco desencadeiam o estresse oxidativo que leva à disfunção endotelial e resulta nas complicações crônicas do DM (ver texto). Adaptado de Cai e Harrison (2000), De Vriese *et al.* (2000), Bayraktutan (2002), Skrha (2003), Endemann e Schiffrin (2004), He e King (2004), Li e Shah (2004), Wassmann *et al.* (2004) e Yokoyama (2004).

Assim, o acúmulo de EROs como uma característica do estresse oxidativo representa o mecanismo “unificador” dos diferentes eventos patogênicos envolvidos nas disfunções vasculares do DM e pode ser considerado como a causa e a consequência da disfunção endotelial (Stehouwer e Schalkwijk, 2004).

1.4. A Genética das Complicações Crônicas do DM

1.4.1. A genética da retinopatia e da nefropatia diabéticas

Os estudos populacionais e familiares têm demonstrado que as complicações crônicas do DM, embora dependentes do controle glicêmico e do tempo de duração do DM, apresentam um forte componente genético. A patogênese destas complicações se deve à interação da predisposição genética do indivíduo (Jones *et al.*, 2004) com as anormalidades metabólicas e as forças hemodinâmicas (Agardh e Agardh, 2004; Jones *et al.*, 2004).

Embora os estudos multicêntricos tenham conclusivamente demonstrado que o controle glicêmico previne o desenvolvimento e retarda a progressão das complicações vasculares do DM (UKPDS, 1998), sabe-se que existe um subgrupo de pacientes que jamais desenvolve RD e/ou ND, a despeito de um controle metabólico deficiente. Por outro lado, há indivíduos que desenvolvem complicações crônicas apesar de controlarem rigorosamente sua glicemia (Dantas, 2004; Gouvêa, 2004). Além disso, os estudos epidemiológicos observaram que a incidência anual de macroalbuminúria eleva-se paulatinamente, atinge seu pico ao redor dos 17 anos de DM e depois declina, praticamente desaparecendo após os 40 anos de doença (Gouvêa, 2004).

A prevalência de RD e ND varia consideravelmente entre os diferentes grupos étnicos, sendo mais freqüente em populações de origem negróide, indígena, hispânica, asiática e polinésia em comparação às populações caucasóides. No entanto, este incremento excede à proporção que pode ser atribuída à alta freqüência de DM2 e fatores de risco associados nessas populações (Warpeha e Chakravarthy, 2003; Jones *et al.*, 2004).

Diversos estudos demonstraram um alto grau de agregação familiar na ocorrência de ND em pacientes com DM2 (Chowdhury *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2004). Um estudo no Brasil demonstrou que somente 5% dos irmãos de probandos normoalbuminúricos apresentavam macroalbuminúria, ao passo que 24% dos irmãos de probandos macroalbuminúricos também tinham macroalbuminúria. Além disso, observou-se que a presença de ND no probando triplicou o risco do seu irmão desenvolver esta complicação (Canani *et al.*, 1999).

Em relação à RD, um estudo recente de pares de irmãos afetados por DM2 observou que os irmãos de probandos com RD apresentavam um risco três vezes maior de desenvolver esta complicação comparados aos irmãos de probandos sem RD, independentemente de outros fatores de risco (Rema *et al.*, 2002).

Inúmeros estudos têm sido realizados com o intuito de identificar os genes que conferem susceptibilidade às complicações do DM. Os principais métodos atualmente utilizados para a investigação de determinantes genéticos em doenças poligênicas de início tardio são os estudos de associação com marcadores polimórficos (dos tipos caso-controle e “family-based”) e os estudos de ligação (varredura ampla do genoma ou “genome-wide scan”) (Chowdhury *et al.*, 1999; Ripplin *et al.*, 2001; Warpeha e Chakravarthy, 2003).

Os estudos de associação do tipo caso-controle envolvem a comparação das frequências gênicas e genóticas obtidas para variantes genéticas em pacientes diabéticos com a complicação (casos) e pacientes sem a complicação (controles). Os genes candidatos examinados neste tipo de estudo são selecionados em virtude de seu possível papel na patogênese da angiopatia sob estudo (Chowdhury *et al.*, 1999). Os possíveis genes candidatos para a RD e a ND incluem os genes que codificam produtos envolvidos no metabolismo da glicose e na função endotelial (Chowdhury *et al.*, 1999; Warpeha e Chakravarthy, 2003).

Um outro tipo de estudo de associação é a análise de genes candidatos utilizando o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT). Este método examina a frequência com que um determinado alelo é transmitido através de genitores heterozigotos para a prole afetada. Um desvio significativo da proporção Mendeliana sugere que o alelo está envolvido na susceptibilidade da doença em questão (Chowdhury *et al.*, 1999; Strachan e Read, 1999).

Os estudos de ligação baseiam-se na procura por determinantes genéticos em famílias com pares de irmãos que têm DM. Existem duas abordagens possíveis: analisar irmãos que têm ND (“affected sib-pairs”) ou irmãos que são discordantes para a ND (“discordant sib-pairs”). Neste tipo de estudo, o genoma humano pode ser rastreado usando-se marcadores polimórficos para testar a ligação de regiões cromossômicas à doença (Chowdhury *et al.*, 1999; Strachan e Read, 1999).

O estudo de caso-controle é o método mais utilizado. Variantes genéticas em mais de 50 genes candidatos têm sido descritas e investigadas em relação à patogênese da RD (tabela 1) e da ND (tabela 2) em pacientes com DM2, de diferentes grupos étnicos. Porém, até o momento, poucos estudos têm demonstrado uma associação significativa entre um gene candidato e a frequência ou a severidade das complicações microvasculares

(Chowdhury *et al.*, 1999; Warpeha e Chakravarthy, 2003; Jones *et al.*, 2004).

Tabela 1. Genes candidatos para a RD em estudos de caso-controle no DM2

Genes	Cromossomos
Sistema renina/angiotensina/aldosterona	
angiotensinogênio (AGT)	1q
quimase (CMA1)	14q
enzima conversora de angiotensina (ACE)	17q
Fatores vasoativos	
endotelina 1 (EDN1)	6p
óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS)	7q
Proteínas de adesão, matriz extracelular e citoesqueleto	
colágeno do tipo IV (COL4A1)	13q
molécula de adesão intercelular (ICAM1)	19p
inibidor tissular da metaloproteinase 3 (TIMP3)	22q
Proteínas da coagulação e fibrinólise	
inibidor 1 do ativador do plasminogênio (PAI-1)	7q
fator von Willebrand (FvW)	12p
integrina alfa-2-beta-1 (receptor plaquetário de colágeno) ($\alpha 2\beta 1$)	---
Metabolismo lipídico	
proteína ligante de ácidos graxos, intestinal (FABP2)	4q
paraoxonase 1 (PON1)	7q
apolipoproteína E (APOE)	19q

Adaptado de Warpeha e Chakravarthy (2003). Localização cromossômica disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink> (acessado em 09/02/2005).

Tabela 1 (continuação)

Genes	Cromossomos
Fatores hormonais, metabólicos e de sinalização	
metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR)	1p
transportador de glicose do tipo 1 (GLUT1)	1p
adiponectina (ADIPOQ)	3q
receptor gama de proliferação ativada do peroxissomo (PPAR γ)	3p
glutamina-frutose-6-fosfato transaminase 2 (GFPT2)	5q
fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	6p
fator de necrose tumoral (TNF)	6p
receptor para os produtos finais de glicação avançada (RAGE)	6p
aldose redutase (AR)	7q
neuropeptídeo Y (NPY)	7p
receptor adrenérgico beta-3 (ADRB3)	8p
aldeído desidrogenase 2 (ALDH2)	12q
receptor de vitamina D (VDR)	12q
sorbitol desidrogenase (SDH)	15q
fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF)	17p
fator beta de crescimento transformante (TGF- β 1)	19q
Fatores imunológicos	
antígenos leucocitários humanos (HLA)	6p
imunoglobulina M (IgM)	14q
óxido nítrico sintetase induzível (iNOS)	17q

Adaptado de Warpeha e Chakravarthy (2003). Localização cromossômica disponível em

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink> (acessado em 09/02/2005).

Tabela 2. Genes candidatos para a ND em estudos de caso-controle no DM2

Genes	Cromossomos
Sistema renina/angiotensina/aldosterona	
angiotensinogênio (AGT)	1q
renina (REN)	1q
receptor 1 de angiotensina II (AGTR1)	3q
enzima conversora de angiotensina (ACE)	17q
Fatores vasoativos	
peptídeo natriurético atrial (ANP)	1p
óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS)	7q
receptores de bradicinina 1 e 2 (BDKRB1 e BDKRB2)	14q
glicoproteína plaquetária IIb/IIIa (ITGA2B)	17q
Proteínas de adesão, matriz extracelular e citoesqueleto	
seletina L (SELL)	1q
alfa-2-macroglicina (ADD1)	4p
colágeno do tipo 4, alfa-1 (COL4A1)	13q
metaloproteinase 9 (MMP-9)	20q
Metabolismo lipídico	
paraoxonases 1 e 2 (PON1 e PON2)	7q
lipoproteína lipase (LPL)	8p
apolipoproteína A1 (APOA1)	11q
apolipoproteína E (APOE)	19q
proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP)	16q
Fatores imunológicos	
antígenos leucocitários humanos (HLA)	6p
antagonista do receptor de interleucina 1 (IL1RN)	2q
interleucina 1 (IL-1)	2q
receptores de quimiocina 2 e 5 (CCR2 e CCR5)	3p
interleucina 6 (IL-6)	7p

Adaptado de Chowdhury *et al.* (1999) e Jones *et al.* (2004). Localização cromossômica disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink> (acessado em 10/02/2005).

Tabela 2 (continuação)

Genes	Cromossomos
Fatores hormonais, metabólicos e de sinalização	
glutationa S-transferase M1 (GSTM1)	1p
metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR)	1p
transportador de glicose do tipo 1 (GLUT1)	1p
adiponectina (ADIPOQ)	3q
receptor gama de proliferação ativada do peroxissomo (PPAR γ)	3p
glutamina-frutose-6-fosfato transaminase 2 (GFPT2)	5q
hemocromatose (HFE)	6p
pirofosfatase/fosfodiesterase 1 ecto-nucleotídeo (ENPP1)	6q
receptor para os produtos finais de glicação avançada (RAGE)	6p
superóxido dismutase 2, mitocondrial (SOD2)	6q
aldose redutase (AR)	7q
receptor adrenérgico beta-3 (ADRB3)	8p
adrenomedulina (ADM)	11p
insulina (INS)	11p
subunidade β 3 da proteína G (GNB3)	12p
sorbitol desidrogenase (SDH)	15q
subunidade p22phox da NAD(P)H oxidase (CYBA)	16q
transportador de Na ⁺ /Cl ⁻ (SLC12A3)	16q
N-acetiltransferase (AANAT)	17q
fator beta de crescimento transformante (TGF- β 1)	19q
Proteínas da coagulação e fibrinólise	
calicreína (KLKB1)	4q
inibidor 1 do ativador do plasminogênio (PAI-1)	7q

Adaptado de Chowdhury *et al.* (1999) e Jones *et al.* (2004). Localização cromossômica disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink> (acessado em 10/02/2005).

Em relação às análises de ligação, um estudo nos índios Pima utilizou o método de varredura ampla do genoma para identificar genes de susceptibilidade para a RD e a ND em famílias usando pares de irmãos afetados (Imperatore *et al.*, 1998). Os autores encontraram evidências de ligação de marcadores genéticos nos cromossomos 3 e 9 com a retinopatia e a nefropatia, mas nenhuma região genômica foi ligada somente à presença de RD. Neste estudo, além dos cromossomos 3 e 9, marcadores nos cromossomos 7 e 20 também estiveram ligados à ND, sendo que a ligação mais forte foi observada para marcadores do cromossomo 7, próximo à região dos genes da aldose redutase e da óxido nítrico sintetase endotelial (Imperatore *et al.*, 1998). Outros estudos de ligação em pacientes com DM2 encontraram ligação da ND com os genes do sistema renina/angiotensina/aldosterona em afro-americanos e italianos e com marcadores nos cromossomos 12 e 20 em europeus (Chowdhury *et al.*, 1999; Lindner *et al.*, 2003).

Estudos mais recentes propõem a utilização de métodos de análise do transcriptoma, através dos quais pode-se identificar os genes que são diferencialmente expressos em modelos de doenças *in vitro* e *in vivo*, sem requerer o conhecimento prévio dos genes envolvidos em uma determinada doença (Connolly *et al.*, 2003). A aplicação desta metodologia em um modelo de ND *in vitro* possibilitou a identificação de novos genes candidatos potenciais que têm sua expressão aumentada pela hiperglicemia, incluindo a grelina e proteínas regulatórias do citoesqueleto (Connolly *et al.*, 2003).

Uma outra abordagem potencial para o mapeamento genético é o mapeamento por miscigenação (“admixture mapping”). Este tipo de mapeamento baseia-se na história populacional de populações com fluxo gênico (tais como os afro-americanos) para mapear os alelos de susceptibilidade às doenças (Kittles e Weiss, 2003). O Instituto Nacional de

Diabetes e Doenças Renais e Digestivas dos Estados Unidos instituiu recentemente um consórcio multicêntrico com o objetivo de identificar os genes responsáveis pelo desenvolvimento da ND, em famílias pertencentes a quatro diferentes grupos étnicos (hispano-, afro-, indo- e euro-americanos) (Knowler *et al.*, 2005).

Os estudos com modelos animais identificaram duas regiões cromossômicas distintas ligadas à doença renal em ratos geneticamente hipertensos que desenvolvem falência renal crônica precocemente. Por meio da utilização de mapas de sintenia pode-se buscar homólogos destes genes no genoma humano e testar sua ligação com a ND em humanos (Chowdhury *et al.*, 1999).

1.4.2. A genética da doença arterial coronariana e do infarto agudo do miocárdio

Os estudos epidemiológicos e em modelos animais têm demonstrado que a patogênese da aterosclerose depende da interação de múltiplos fatores genéticos e ambientais (Sobel, 2002; Lusis *et al.*, 2004; Tracy, 2004). Os estudos familiares têm estimado que a herdabilidade do IAM varia entre 25% a 60%, dependendo da idade e do grupo étnico dos indivíduos analisados (Lusis *et al.*, 2004). Já os estudos de gêmeos revelaram a existência da influência genética no risco de morte por DAC, nos quais os gêmeos monozigóticos apresentavam um risco maior de mortalidade por DAC do que os gêmeos dizigóticos entre os indivíduos com menos de 55 anos (Grant, 2003).

Os estudos de varredura do genoma em humanos observaram vários locos ligados à DAC ou ao IAM, incluindo marcadores nos cromossomos 1p, 2q, 14qter, 16p e Xq. Até o momento, porém, nenhum gene específico foi identificado. Por meio da genômica

comparativa, observou-se que a maior parte dos locos ligados à aterosclerose identificados em camundongos não têm relação com os níveis plasmáticos de lipídios, a pressão sanguínea ou outros fatores de risco sistêmicos, como tem sido investigado em humanos (Lusis *et al.*, 2004).

Assim como para as complicações microvasculares, inúmeros estudos de associação em relação à DAC e ao IAM têm obtido resultados inconsistentes (Grant, 2003; Lusis *et al.*, 2004). Como pode ser visualizado na tabela 3, os genes candidatos mais estudados são aqueles relacionados à hemostasia e ao remodelamento da matriz extracelular (Lusis *et al.*, 2004).

Assim sendo, apresentaremos nas próximas seções uma breve síntese dos estudos que envolvem dados pertinentes à presente tese.

Tabela 3. Genes candidatos para a DAC e o IAM em estudos de caso-controle

Genes	Cromossomos
Proteínas da coagulação e fibrinólise	
trombopoietina (THPO)	3q
fibrinogênio (FG)	4q
fatores VII (FVII), XII (FXII) e XIII (FXIII)	13q / 5q / 1q
inibidor 1 do ativador do plasminogênio (PAI-1)	7q
ativador tissular do plasminogênio (tPA)	8p
glicoproteínas plaquetárias IIb/IIIa (ITGA2B) e VI (GP6)	17q / 19q
trombomodulina (THBD)	20p

Adaptado de Grant (2003) e Lusis *et al.* (2004). Localização cromossômica disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink> (acessado em 10/02/2005).

Tabela 3 (continuação)

Genes	Cromossomos
Proteínas de adesão, matriz extracelular e citoesqueleto	
seletinas E e P (SELE e SELP)	1q
colágeno do tipo 3 (COL3A1)	2q
alfa-aducina (ADD1)	4p
metaloproteinases 3 e 12 (MMP-3 e MMP-12)	11q
metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9)	16q / 20q
Sistema renina/angiotensina/aldosterona	
enzima conversora de angiotensina (ACE)	17q
Fatores vasoativos	
óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS)	7q
Metabolismo lipídico	
paraoxonases 1 e 2 (PON1 e PON2)	7q
apolipoproteína E (APOE)	19q
Fatores imunológicos	
interleucina-6 (IL6)	7p
fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) (TNFAIP1)	17q
Fatores hormonais, metabólicos e de sinalização	
glutathiona S-transferase M1 (GSTM1)	1p
receptor adrenérgico beta-2 (ADRB2)	5q
receptor para os produtos finais de glicação avançada (RAGE)	6p

Adaptado de Grant (2003) e Lusic *et al.* (2004). Localização cromossômica disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink> (acessado em 10/02/2005).

1.4.3. O receptor dos produtos finais de glicação avançada (RAGE)

O RAGE é um membro da superfamília das imunoglobulinas que atua como um receptor para os produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Stern *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2003; Naka *et al.*, 2004; Rojas e Morales, 2004; Ahmed, 2005). Os AGEs são formados a partir da glicação não-enzimática, um processo pelo qual açúcares redutores, tais como a glicose, reagem com proteínas, gerando produtos quimicamente estáveis e com modificações irreversíveis. O processo de formação dos AGEs ocorre por meio de uma série de reações químicas, que podem envolver proteínas da membrana celular, proteínas intra- e extracelulares, bem como lipídios e ácidos nucleicos (Singh *et al.*, 2001; Vlassara e Palace, 2002; Rojas e Morales, 2004; Ahmed, 2005). A glicação não-enzimática é uma reação espontânea que depende do grau e duração da hiperglicemia, da meia-vida da macromolécula envolvida e da permeabilidade tissular à glicose (Ahmed, 2005).

Os AGEs são compostos heterogêneos e complexos que apresentam propriedades químicas e biológicas potencialmente patogênicas, levando à alteração da estrutura, da função e do “turnover” das macromoléculas glicadas (Singh *et al.*, 2001; Vlassara e Palace, 2002; Rojas e Morales, 2004; Ahmed, 2005). Estes efeitos podem ocorrer por meio de vários mecanismos, dependentes ou não da interação com receptores celulares. Entre os efeitos diretos estão a formação de ligações cruzadas entre proteínas, o bloqueio do fluxo de proteínas não-glicadas, a resistência à digestão proteolítica, a indução da oxidação de ácidos nucleicos, lipídios e lipoproteínas e, a inibição da produção e da ação do vasodilatador óxido nítrico. Além disso, os AGEs se ligam a seus receptores celulares, induzindo uma cascata de reações que culminam na disfunção endotelial (Singh *et al.*, 2001; Vlassara e Palace, 2002; Yan *et al.*, 2003; Rojas e Morales, 2004; Ahmed, 2005).

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* em pacientes com DM e em modelos animais têm demonstrado que a formação e o acúmulo dos AGEs podem contribuir para o desenvolvimento e a severidade das complicações crônicas do DM (Singh *et al.*, 2001; Vlassara e Palace, 2002; Stitt, 2003; Rojas e Morales, 2004; Ahmed, 2005).

O RAGE é um receptor multi-ligante expresso na superfície de uma variedade de células, incluindo as células endoteliais, as células musculares lisas, os pericitos, os podócitos, os macrófagos e os astrócitos (Hudson e Schmidt, 2004; Rojas e Morales, 2004; Ahmed, 2005). O RAGE apresenta um padrão temporal em sua expressão, no qual altos níveis são observados durante o desenvolvimento inicial do organismo, ao passo que a expressão é reduzida em animais adultos (Stern *et al.*, 2002).

Contudo, estudos *in vitro*, em modelos animais e em pacientes diabéticos constataram que o RAGE é altamente expresso em tecidos susceptíveis às complicações do DM (células endoteliais retinianas e renais, e nas placas ateroscleróticas), concomitante com o acúmulo de AGEs. Além disso, estudos recentes demonstraram que o bloqueio da interação AGE-RAGE, diretamente ao nível protéico ou por transgenia, pode reduzir ou reverter o desenvolvimento das complicações micro- e macrovasculares em modelos animais (Stern *et al.*, 2002; Wendt *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003; Hudson e Schmidt, 2004; Naka *et al.*, 2004; Rojas e Morales, 2004; Ahmed, 2005).

Originalmente, acreditava-se que em condições homeostáticas, o RAGE atuasse apenas como um mediador na remoção dos AGEs. Atualmente sabe-se que, além dos AGEs, o RAGE também pode ser estimulado por outros tipos de ligantes, incluindo as S100/calgranulinas (grupo de citocinas pró-inflamatórias), anfoterina, HMGB1, entre outros. Desta forma, o RAGE parece atuar como um transdutor de sinal na propagação de respostas imunes/inflamatórias (Stern *et al.*, 2002; Chavakis *et al.*, 2004; Ahmed, 2005).

No DM, devido à interação permanente com os elevados níveis de AGEs, ocorre uma ativação prolongada do receptor, induzindo o estresse oxidativo. O estresse oxidativo ativa vias de sinalização intracelular, levando à secreção de citocinas pró-inflamatórias e ao aumento da expressão de moléculas de adesão, vasoconstrição e coagulação (Naka *et al.*, 2004; Rojas e Morales, 2004; Ahmed, 2005). Estas, por sua vez, também desencadeiam a formação de radicais livres, gerando um ciclo de retroalimentação positiva. Assim, existem evidências de que este receptor atua como um propagador da disfunção endotelial que ocorre no desenvolvimento das complicações vasculares do DM, na medida em que a célula se torna rica em ligantes do RAGE (Stern *et al.*, 2002; Wendt *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003; Chavakis *et al.*, 2004; Naka *et al.*, 2004).

O gene do RAGE (6p21.3) se localiza próximo ao loco do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (Sugaya *et al.*, 1994), em uma região caracterizada por alta densidade de genes, com sobreposição de genes e um grande número de genes envolvidos em respostas imunes (Sugaya *et al.*, 1994; Strachan e Read, 1999). O transcrito primário do RAGE contém 11 exons e codifica uma proteína madura de 404 aminoácidos (Neeper *et al.*, 1992). Estudos recentes identificaram novos transcritos codificando variantes solúveis truncadas do RAGE, sugerindo que o padrão tecido-específico na expressão deste receptor ocorre por “splicing” alternativo (Schlueter *et al.*, 2003; Yonekura *et al.*, 2003). O papel fundamental desempenhado pelo RAGE nas complicações vasculares torna o RAGE um gene candidato em potencial para a identificação de variantes alélicas que alteram a sua expressão e, conseqüentemente, que possam afetar o desenvolvimento das complicações crônicas do DM.

Entre as várias mutações descritas no gene do RAGE (Hudson *et al.*, 1998, 2001a; Poirier *et al.*, 2001), três polimorfismos identificados na região promotora se destacam por exercerem um forte efeito na atividade transcricional deste gene: duas mutações de ponto, -429T>C e -374T>A, e uma inserção/deleção (I/D) de 63-pb, que abrange os nucleotídeos -407 a -345. Um estudo de genes repórter observou que os alelos -429C, -374A e D aumentam a expressão do gene do RAGE em duas, três e quatro vezes, respectivamente, comparados à construção com os respectivos alelos selvagens (Hudson *et al.*, 2001a).

Os poucos estudos que analisaram a relação entre esses três polimorfismos e a ocorrência das complicações crônicas do DM têm demonstrado resultados contraditórios. Primeiramente, observou-se que o alelo -429C estava relacionado à presença de RD em britânicos com DM2 (Hudson *et al.*, 2001a). No entanto, estudos posteriores não encontraram evidência de associação entre os polimorfismos -429T>C e -374T>A com a cardiopatia isquêmica em britânicos com DM2 (Hudson *et al.*, 2001b), e com a RD em caucasóides (Petrovic *et al.*, 2003) e chineses (JiXiong *et al.*, 2003) com DM2.

Porém, estudos recentes demonstraram que o alelo -374A está associado a um risco reduzido de desenvolvimento de proteinúria e doença cardiovascular em finlandeses com DM1 (Pettersson-Fernholm *et al.*, 2003) e DAC em italianos sem DM (Falcone *et al.*, 2004). Além disso, um estudo observou que o alelo D está associado a um risco menor de desenvolvimento de ND em alemães com DM2, mas não em pacientes com DM1 (Rudofsky Jr. *et al.*, 2004).

1.4.4. A aldose redutase (AR)

Um segundo tipo de reação bioquímica relacionada à hiperglicemia é a ativação da via do sorbitol (ou poliols), na qual a glicose é reduzida a sorbitol pela aldose redutase (AR), uma enzima intracelular dependente de NADPH. O sorbitol assim formado é convertido à frutose pela sorbitol desidrogenase (Brownlee, 2001; Petrash, 2004).

Como a AR apresenta uma baixa afinidade pela glicose, sob condições normais de glicemia somente uma pequena parte da glicose é metabolizada através da via do poliols. Contudo, no DM, devido à hiperglicemia crônica, o fluxo de glicose através desta via é acelerado, podendo corresponder a 33% da utilização de glicose, em determinados tecidos (Brownlee, 2001; Petrash, 2004).

A aldose redutase é um membro da superfamília das aldo-ceto redutases (AKRs), composta por mais de 40 enzimas estruturalmente e evolutivamente relacionadas (<http://www.med.upenn.edu/akr/>). A AR exibe uma ampla especificidade por aldeídos e cetonas hidrofóbicas, incluindo xenobióticos e compostos endógenos. Além da glicose, os principais substratos endógenos são a galactose, os esteróides e seus precursores, diversos subprodutos do estresse oxidativo, como os compostos intermediários gerados durante a formação dos AGEs e os aldeídos derivados da oxidação de lipídios, entre outros (Petrash, 2004).

Além dessa afinidade por diferentes substratos, a ampla expressão da AR em diversos tecidos (incluindo a retina, o rim, o fígado, a placenta e o cérebro), sugere que ela possa funcionar como uma proteína “housekeeping” sob condições fisiológicas (Petrash, 2004). Estudos recentes observaram que a AR atua na regulação osmótica renal, na detoxificação de toxinas ambientais, na defesa antioxidante, e também na modulação da resistência a drogas quimioterápicas (Petrash, 2004).

Inúmeros estudos em pacientes com DM e em modelos animais têm demonstrado que a aceleração da via do sorbitol no DM, por meio do aumento na atividade da AR, exerce um importante papel na patogênese das complicações crônicas do DM (Brownlee, 2001; Petrash, 2004). A expressão da AR, que tem sido detectada nas células retinianas (Sato *et al.*, 1999; Dagher *et al.*, 2004), nos podócitos glomerulares e nas células de Schwann dos nervos periféricos (Gabbay, 1973), coincide justamente com os órgãos afetados pelas complicações microvasculares.

Vários estudos verificaram que os níveis de AR estão aumentados nas células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos polimorfonucleares e células mononucleares periféricas) de pacientes com DM2, com complicações microvasculares (Nishimura *et al.*, 1997; Hasegawa *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2000). Análises imuno-histoquímicas também revelaram um aumento na expressão da AR nas células retinianas de pacientes com DM de longa duração, cuja expressão estava diretamente correlacionada à severidade da RD (Vinores *et al.*, 1988).

Os estudos em modelos animais, incluindo camundongos transgênicos que superexpressam o gene da AR, também demonstraram que a hiperglicemia aumenta o fluxo de glicose através da via do sorbitol, levando ao desenvolvimento de retinopatia (den Enden *et al.*, 1995; Yamaoka *et al.*, 1995) e nefropatia diabéticas (Yamaoka *et al.*, 1995). Além disso, observou-se que a produção de sorbitol foi bastante reduzida nas células renais de camundongos nocauteados para o gene da AR (Ho *et al.*, 2000).

Apesar do consenso de que a aceleração da via do poliols, por meio do aumento da expressão da AR está correlacionada à patogênese das complicações crônicas do DM, vários mecanismos foram propostos para explicar os efeitos deletérios do sorbitol no metabolismo celular (Brownlee, 2001; Petrash, 2004). Como o sorbitol e a frutose são

lentamente metabolizados e dificilmente se difundem através da membrana celular, foi originalmente sugerido que o excesso de sorbitol acumulado nas células desencadearia uma série de efeitos deletérios, tais como o aumento da pressão osmótica intracelular e o influxo de água e a redução da atividade da Na^+/K^+ ATPase (Brownlee, 2001).

No entanto, estudos recentes têm proposto vários mecanismos alternativos para explicar o desequilíbrio no balanço redox intracelular causado pela aceleração da via do polioliol, como demonstrado na figura 2.

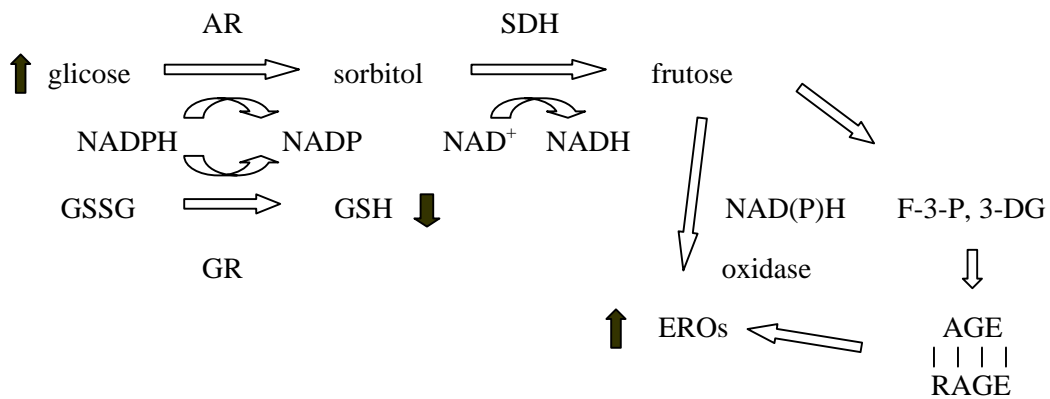


Figura 2. Esquema simplificado demonstrando os mecanismos pelos quais a hiperglicemia leva ao aumento na geração das EROs (adaptado de Chung *et al.*, 2003). Primeiro, a redução de glicose a sorbitol pela AR é uma reação que consome o cofator NADPH, também requerido pela glutatona redutase (GR) para regenerar a forma reduzida da glutatona (GSH). Então, na presença de hiperglicemia, a atividade da AR reduz a capacidade antioxidante celular (Brownlee, 2001; Chung *et al.*, 2003). Segundo, a oxidação de sorbitol a frutose pela sorbitol desidrogenase (SDH) leva à formação de EROs, pois neste processo o cofator NAD^+ é convertido a NADH que, por sua vez, serve de substrato para a NAD(P)H oxidase na geração de EROs (Chung *et al.*, 2003). Terceiro, considerando que a frutose e seus metabólitos frutose-3-fosfato (F-3-P) e 3-deoxiglicosona

(3-DG) atuam no processo de glicação não-enzimática, o fluxo da glicose através da via do poliol pode aumentar a formação dos AGEs que, conseqüentemente, se ligam a seus receptores e amplificam a geração de radicais livres (Chung *et al.*, 2003).

Além disso, existem evidências experimentais de que a formação dos AGEs pode ativar a via do poliol (Nakamura *et al.*, 2000), uma vez que os compostos intermediários do processo de glicação avançada, tais como o metilglioxal, são substratos para a AR (Petrash, 2004). Outros estudos têm sugerido que a AR pode interagir com vias de sinalização envolvendo a PKC, cuja ativação também está relacionada à patogênese das complicações vasculares do DM (Brownlee, 2001; Petrash, 2004).

O gene da AR (AKR1B1) localiza-se no cromossomo 7q35 (Graham *et al.*, 1991a), contém 10 exons, apresenta um tamanho aproximado de 17 kb (Graham *et al.*, 1991b) e codifica uma proteína de 315 aminoácidos (Petrash, 2004). Uma mutação de ponto na região promotora do gene da AR (-106C>T) foi descrita em australianos com DM1, nos quais a frequência do alelo -106C foi maior no grupo de pacientes com RD, quando comparados ao grupo de pacientes sem esta complicação (Kao *et al.*, 1999).

Um estudo recente utilizando a análise de gene repórter demonstrou que as construções portadoras do alelo -106C apresentavam uma maior atividade transcricional comparadas às construções que continham o alelo -106T (Yang *et al.*, 2003). Estes resultados sugerem que o polimorfismo -106C>T pode exercer um papel funcional na determinação da expressão do gene da AR e, assim, contribuir para a susceptibilidade ao desenvolvimento das complicações microvasculares do DM.

Com a exceção de um estudo em chineses com DM2 (Li *et al.*, 2002), outros autores não encontraram quaisquer evidências de associação entre o polimorfismo -106C>T e a ocorrência de RD em japoneses (Makiishi *et al.*, 2003), chineses (Wang *et al.*, 2003), finlandeses (Sivenius *et al.*, 2004) e caucasóides brasileiros (Santos *et al.*, 2003) com DM2. No entanto, não existem trabalhos que tenham investigado a relação entre este polimorfismo e a RD proliferativa.

Em relação à ND, o alelo -106T foi correlacionado à presença desta microangiopatia em caucasóides britânicos (Neamat-Allah *et al.*, 2001), japoneses (Makiishi *et al.*, 2003), chineses (Wang *et al.*, 2003), finlandeses (Sivenius *et al.*, 2004) e poloneses (Gosek *et al.*, 2005) com DM2. Entretanto, estes resultados não foram confirmados nos Índios Pima com DM2 (Neamat-Allah *et al.*, 2001).

1.4.5. A óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS, ecNOS, NOS3)

O óxido nítrico (NO) é um gás instável que exerce um papel fundamental em diversos processos biológicos vitais, tais como o controle do tônus vascular, da neurotransmissão, da secreção hormonal e das respostas imunológicas. A maior parte do NO é produzida enzimaticamente, sob a presença de NADPH e oxigênio, pelas óxido nítrico sintetases (NOSs), uma família de três enzimas relacionadas codificadas por genes distintos e com expressão tecido-específica (Förstermann *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2002a). No endotélio, o NO é produzido principalmente pela NOS endotelial (eNOS, ecNOS, NOS3) (Li *et al.*, 2002a; Wheatcroft *et al.*, 2003).

O NO produzido pela eNOS exerce um papel fundamental na regulação da homeostasia vascular. Seus efeitos protetores ocorrem por meio da vasodilatação, da inibição da agregação plaquetária e adesão de leucócitos à parede vascular, e da inibição da proliferação das células do músculo liso (Förstermann *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2002a; Maxwell, 2002). Além disso, o NO reduz o estresse oxidativo intracelular por meio da neutralização dos ânions superóxido (Maxwell, 2002).

Por outro lado, a produção excessiva de NO também pode ser citotóxica, uma vez que essa molécula reage com o ânion superóxido, levando à formação de peroxinitrito (ONOO⁻). O peroxinitrito é um oxidante que causa danos tissulares, por meio da peroxidação de lipídios, da depleção de antioxidantes plasmáticos e de alterações na função protéica, que culminam na morte das células endoteliais (Bayraktutan, 2002).

A eNOS endotelial é expressa em células endoteliais bem como em uma variedade de outros tipos de células e tecidos, tais como o coração, as células sanguíneas, o sistema nervoso central, o sistema digestivo e o sistema reprodutor (Förstermann *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2002a). Embora a eNOS seja uma enzima constitutivamente expressa, sua expressão pode ser regulada por diversos estímulos bioquímicos e biofísicos, que afetam a atividade do promotor e/ou a estabilidade do RNAm, tanto sob condições fisiológicas quanto patológicas (Förstermann *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2002a; Wheatcroft *et al.*, 2003).

Diversos estudos em modelos animais e em cultura de células têm demonstrado que o “shear stress” produzido pelo fluxo sanguíneo, a prática regular de exercício físico, o consumo moderado de álcool, os fatores de crescimento, os hormônios (como o estrógeno e a insulina, por exemplo), os fosfolipídios derivados da oxidação do LDL (Li *et al.*, 2002a) e o tratamento com estatinas, inibidores da enzima conversora de angiotensina e antioxidantes são fatores que aumentam a expressão e/ou a atividade da eNOS (Li *et al.*,

2002b). Por outro lado, as citocinas, o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano e o próprio NO na circulação sistêmica (Li *et al.*, 2002a), bem como o uso de glicocorticóides diminuem a expressão da eNOS (Li *et al.*, 2002b).

Camundongos nocauteados para o gene da eNOS são hipertensos, carecem de vasodilatação dependente do endotélio (mediado pelo NO), apresentam maior proliferação da camada íntima e são mais propensos a desenvolver isquemia cerebral, insuficiência cardíaca e hipertensão pulmonar em comparação aos controles (Li *et al.*, 2002a).

Sob condições patológicas, como na presença de resistência à insulina, DM, hipercolesterolemia, aterosclerose ou hipertensão, a expressão de eNOS encontra-se alterada, cujo padrão depende do estágio, severidade e duração da doença. Quando ocorre um aumento na expressão da eNOS, esse aumento é freqüentemente acompanhado por uma redução da biodisponibilidade de NO (devido a uma menor geração ou sensibilidade de NO ou uma maior inativação do NO) e por um aumento na produção de radicais livres (Shinozaki *et al.*, 2000; Channon e Guzik, 2002; Li *et al.*, 2002b; Maxwell, 2002). Na ausência do substrato (arginina) ou de seus cofatores, bem como em resposta a estímulos aterogênicos, tais como a hiperglicemia e a resistência à insulina, a eNOS deixa de produzir NO e passa a produzir moléculas de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Esse fenômeno é referido como o desacoplamento da eNOS, que pode levar à disfunção endotelial observada no DM (Cai e Harrinson, 2000; Channon e Guzik, 2002).

O gene que codifica a eNOS (7q35) contém 26 exons e codifica uma proteína altamente conservada entre várias espécies de mamíferos (Li *et al.*, 2002a). Foi sugerido que polimorfismos no gene da eNOS podem alterar os níveis ou a atividade desta enzima, levando à redução ou ao excesso de produção de NO, podendo contribuir para vários processos patológicos (Förstermann *et al.*, 1998; Hingorani, 2000; Wang e Wang, 2000).

Entre os diversos polimorfismos descritos no gene da eNOS, dois se destacam: uma substituição de base na região promotora (-786T>C), e uma substituição de base no exon 7 (894G>T), que leva a uma troca de aminoácido na posição 298 da proteína (E298D) (Hingorani, 2000; Wang e Wang, 2000). Ambos polimorfismos têm sido investigados em diversas populações em relação à DAC, à hipertensão e ao IAM, mas os resultados obtidos são inconsistentes (Wang e Wang, 2000). Estudos funcionais têm demonstrado que o alelo -786C reduz a atividade do promotor da eNOS em até 50% (Nakayama *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2000).

Observou-se que os polimorfismos -786T>C e 894G>T estavam associados à ND (Shin *et al.*, 2004), à resistência à insulina (Ohtoshi *et al.*, 2002; Monti *et al.*, 2003) e à doença renal crônica terminal (Asakimori *et al.*, 2002; Noiri *et al.*, 2002; Nagase *et al.*, 2003) em pacientes com DM2 de diferentes grupos étnicos, mas estes resultados não foram confirmados em outros estudos (Cai *et al.*, 1998; Freedman *et al.*, 2000; Pulkkinen *et al.*, 2000; Ukkola *et al.*, 2001; Awata *et al.*, 2004).

1.4.6. As paraoxonases 1 e 2 (PON1 e PON2)

A paraoxonase 1 (PON1) é uma esterase dependente de cálcio, sintetizada no fígado e secretada no sangue, onde encontra-se exclusivamente associada ao HDL. A PON1 apresenta a capacidade de hidrolisar uma ampla variedade de compostos, tais como os organofosforados tóxicos (encontrados em pesticidas), os gases neurotóxicos utilizados na guerra química (como o sarin e o soman, por exemplo) e as lactonas (constituintes de plantas, aromatizantes de alimentos industrializados, glicocorticóides e hipolipemiantes) (Costa *et al.*, 2003; Draganov e La Du, 2004).

Além disso, estudos *in vitro* com PON1 purificada e em cultura celular, bem como estudos em modelos animais transgênicos e nocauteados demonstram que a PON1 possui propriedades anti-aterogênicas por proteger os tecidos vasculares contra o estresse oxidativo (Draganov e La Du, 2004; Ng *et al.*, 2005). Entre os possíveis mecanismos pelos quais a PON protege contra a aterosclerose incluem a proteção do colesterol HDL e do colesterol LDL contra a oxidação, a reversão dos efeitos deletérios do LDL oxidado e a redução dos níveis de peróxidos de lipídios nas lesões ateroscleróticas (Aviram e Rosenblat, 2004; Draganov e La Du, 2004; Ng *et al.*, 2005).

Os níveis séricos e a atividade da PON1 apresentam uma grande variabilidade interindividual, que podem ser modulados por fatores genéticos e ambientais, tais como a dieta, o estilo de vida, o uso de drogas terapêuticas e a presença de condições fisiopatológicas (Costa *et al.*, 2003; Draganov e La Du, 2004; Ng *et al.*, 2005). Entre os fatores que aumentam a expressão da PON1 estão o consumo moderado de álcool, a ingestão de vitaminas C e E e o uso do hipolipemiante sinvastina (Costa *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2005) e da terapia de reposição hormonal (Sutherland *et al.*, 2001). Por outro lado, gravidez (Costa *et al.*, 2003), menopausa (Senti *et al.*, 2001), tabagismo (Boemi *et al.*, 2004), alimentação rica em gordura, infecções, inflamação (Costa *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2005) e hiperhomocisteinemia (Janel *et al.*, 2004) reduzem os níveis e/ou a atividade da PON1.

Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado que os níveis séricos e/ou a atividade da PON1 estão reduzidos em indivíduos com doença renal, síndrome metabólica, em pacientes com DM2 e em pacientes diabéticos com complicações vasculares (Inoue *et al.*, 2000; Senti *et al.*, 2003; Aviram e Rosenblat, 2004; Draganov e La Du, 2004).

A paraoxonase 2 (PON2) é uma proteína intracelular amplamente expressa que possui propriedades antioxidantes (Ng *et al.*, 2001). Estudos experimentais com PON2 purificada, cultura de células e modelos animais sugerem que a PON2 reduz a produção de peróxidos de lipídios e a oxidação do LDL, atuando como um antioxidante intracelular. Ao contrário da PON1, os níveis e a atividade da PON2 aumentam em resposta ao estresse oxidativo (Aviram e Rosenblat, 2004; Ng *et al.*, 2005).

Os genes da paraoxonase compreendem uma família multigênica composta por três membros (PON1, PON2 e PON3) localizados no cromossomo 7q21-22. Os três genes são altamente conservados e contêm nove exons (Primo-Parmo *et al.*, 1996). As três paraoxonases possuem propriedades antioxidantes, embora suas funções fisiológicas não estejam totalmente definidas (Aviram e Rosenblat, 2004; Draganov e La Du, 2004).

Entre as variantes genéticas que podem modular a expressão do gene da PON1 e/ou a atividade enzimática, destacam-se dois polimorfismos: uma mutação de ponto na região promotora (-108T>C) e uma mutação de ponto no exon 6 (A>G), que leva à troca de aminoácido na posição 192 da proteína (Q192R) (Koda *et al.*, 2004).

O polimorfismo -108T>C ocorre em uma sequência consenso do sítio de ligação para o fator ativador da transcrição Sp1 (Deakin *et al.*, 2003). Vários estudos funcionais com gene repórter e em células em cultura demonstraram que o alelo -108T apresenta uma atividade menor do que o alelo -108C (Leviev e James, 2000; Suehiro *et al.*, 2000; Brophy *et al.*, 2001). Estimou-se também, que o polimorfismo -108T>C pode ser responsável por até 25% da variação nos níveis séricos da PON1 (Brophy *et al.*, 2001).

Os indivíduos homocigotos para o alelo -108C apresentam uma maior atividade de paraoxonase comparados aos indivíduos homocigotos para o alelo -108T, com os heterocigotos exibindo níveis intermediários (Leviev e James, 2000; Suehiro *et al.*, 2000).

Um estudo com irlandeses octogenários saudáveis revelou que a presença do genótipo –108CC pode estar associada a uma maior longevidade (Campo *et al.*, 2004).

Porém, uma meta-análise recente demonstrou que não há evidências de que o polimorfismo –108T>C esteja associado à doença coronariana (Wheeler *et al.*, 2004). No entanto, indivíduos não-diabéticos homozigotos para o alelo –108T apresentaram níveis séricos de glicose mais elevados do que indivíduos heterozigotos ou homozigotos para o alelo –108C (Leviev *et al.*, 2001a), pois o alelo –108T contribui para uma menor sensibilidade à insulina (Ikeda *et al.*, 2003). Além disso, um estudo investigou a associação entre este polimorfismo e a DAC em caucasóides com DM2, no qual os pacientes homozigotos para o alelo –108T apresentavam um risco maior de desenvolver esta macroangiopatia (James *et al.*, 2000). Em relação à retinopatia e à nefropatia diabéticas, até o momento não foram realizados quaisquer estudos que analisassem a relação entre o polimorfismo –108T>C e as complicações microvasculares em pacientes com DM2.

O polimorfismo Q192R tem sido considerado como um dos principais determinantes genéticos da ampla variabilidade interindividual na atividade da PON1, uma vez que sua atividade é substrato-dependente. A isoforma com o resíduo de glutamina na posição 192 apresenta uma maior atividade com os substratos fenilacetato e diazoxon, enquanto a proteína com o resíduo de arginina apresenta maior atividade com o substrato paraoxon. Considerando que esses substratos são sintéticos, ainda não se identificou a relevância fisiológica deste polimorfismo. Entretanto, inúmeros estudos experimentais *in vitro* e em modelos animais demonstraram que a PON1 com o alelo 192R está associado a um perfil aterogênico (níveis elevados de LDL oxidado, níveis reduzidos de HDL e presença de ateromas) (Costa *et al.*, 2003; Draganov e La Du, 2004; Ng *et al.*, 2005).

A atividade da PON1 também varia entre os diferentes grupos étnicos. Populações asiáticas e africanas tendem a apresentar maior atividade de paraoxonase em comparação às populações de origem européia. Este fato, em parte, se deve à heterogeneidade nas frequências gênicas do polimorfismo Q192R. O alelo Q predomina nas populações caucasóides (0,75 nos italianos da Sardenha), enquanto o alelo R é o mais frequente nas populações de origem asiática e africana (0,79 nos índios Cayapa do Equador) (Scacchi *et al.*, 2003).

Duas meta-análises recentemente publicadas demonstraram resultados contraditórios em relação ao papel do polimorfismo Q192R na patogênese da DAC (Lawlor *et al.*, 2004; Wheeler *et al.*, 2004). Da mesma forma, estudos em pacientes com DM2 são escassos e mostram resultados conflitantes (Cao *et al.*, 1998; Ikeda *et al.*, 1998; James *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2004).

Além disso, um estudo constatou que o alelo 192R estava associado à presença de retinopatia e nefropatia diabéticas em japoneses com DM2 (Murata *et al.*, 2004), enquanto outros estudos não encontraram associação entre este polimorfismo e a presença de microangiopatia em asiáticos (Ikeda *et al.*, 1998) e europeus (Pinizzotto *et al.*, 2001; Letellier *et al.*, 2002) com DM2.

Um polimorfismo descrito no exon 9 do gene da PON2 (C>G), que leva à troca de aminoácido na posição 311 da proteína (S311C) (Mochizuki *et al.*, 1998), foi primeiramente associado à doença cardiovascular em indianos (Sanghera *et al.*, 1998) e holandeses (Leus *et al.*, 2001). Porém, estes resultados não foram confirmados na meta-análise desenvolvida por Wheeler *et al.* (2004).

Em relação às complicações crônicas do DM, um estudo observou que o alelo 311C estava associado à ocorrência de ND em caucasóides com DM2 (Pinizzotto *et al.*, 2001). No entanto, outros estudos não encontraram qualquer evidência de associação entre o polimorfismo S311C e a presença de RD (Mackness *et al.*, 2000; Letellier *et al.*, 2002), ND (Letellier *et al.*, 2002) e DAC (Pinizzotto *et al.*, 2001; Letellier *et al.*, 2002) em caucasóides com DM2.

1.4.7. A NAD(P)H oxidase vascular

As NAD(P)H oxidases são enzimas associadas à membrana que geram o ânion superóxido a partir da redução do oxigênio molecular, utilizando NADH ou NADPH como cofator (Griendling *et al.*, 2000; Hink *et al.*, 2001). A NAD(P)H oxidase, originalmente caracterizada em neutrófilos, onde atua na defesa contra microrganismos (Jones *et al.*, 2000), também está presente nas células vasculares, onde desempenha um importante papel na regulação da homeostasia vascular (Griendling *et al.*, 2000).

Os radicais livres, tais como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), são essenciais para a fisiologia vascular, onde atuam como mensageiros secundários na ativação de diversas vias de sinalização intracelular que controlam o ciclo celular, a apoptose, a inflamação, a hipertrofia das células do músculo liso vascular, a adesão e a migração de monócitos/macrófagos e o remodelamento da matriz extracelular (Griendling *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003; Li e Shah, 2004).

A NAD(P)H oxidase é considerada como a principal fonte geradora de O_2^- no sistema cardiovascular (Griendling *et al.*, 2000; Guzik *et al.*, 2000a; Channon e Guzik, 2002). Porém, a disfunção endotelial mediada pelo excesso de O_2^- produzido pela NAD(P)H oxidase é considerada como um dos principais mecanismos envolvidos na patogênese das doenças vasculares, tais como o DM, a hipercolesterolemia (Guzik *et al.*, 2000a; Hink *et al.*, 2001; Bengtsson *et al.*, 2003) e a nefropatia diabética (Li e Shah, 2003).

A NAD(P)H oxidase vascular consiste de quatro subunidades principais. As subunidades p22phox e gp91phox formam o componente responsável pela transferência de elétrons na membrana celular (citocromo b_{558}), enquanto as subunidades p47phox e p67phox modulam a atividade das proteínas gp91phox e p22phox (Griendling *et al.*, 2000). Evidências recentes sugerem que, ao contrário da NAD(P)H oxidase encontrada em fagócitos, as subunidades da NAD(P)H oxidase vascular mantêm-se permanentemente pré-formadas na região perinuclear (Bayraktutan *et al.*, 2000; Li e Shah, 2003).

A subunidade p22phox, essencial para a atividade da NAD(P)H oxidase (Ushio-Fukai *et al.*, 1996), é constitutivamente expressa em baixos níveis nas células retinianas (Ellis *et al.*, 1998), renais (Griendling *et al.*, 2000), endoteliais, musculares lisas, e nos macrófagos e fibroblastos (Azumi *et al.*, 1999; Griendling *et al.*, 2000; Sorescu *et al.*, 2002). No entanto, sua atividade é elevada nas células retinianas (Ellis *et al.*, 1998) e renais (Etoh *et al.*, 2003) de ratos diabéticos, em áreas infartadas (Fukui *et al.*, 2001), em pacientes com lesões ateroscleróticas (Azumi *et al.*, 1999, 2002; Sorescu *et al.*, 2002), e em resposta a estímulos, tais como os hormônios e as citocinas (Griendling *et al.*, 2000).

O polimorfismo 242C>T, no exon 4 do gene CYBA (16q24), que codifica a subunidade p22phox, resulta em uma troca de aminoácido no resíduo 72 da proteína (H72Y). Este polimorfismo, que ocorre em um dos sítios de ligação ao grupo heme do citocromo b, pode levar à perda da estabilidade da proteína (Dinauer *et al.*, 1990). Assim, espera-se que variantes alélicas que bloqueiem a ligação do grupo prostético heme à subunidade p22phox, reduzam a produção de O_2^- e, conseqüentemente, protejam contra as doenças vasculares (Whitehead e FitzGerald, 2001). De fato, um estudo *ex vivo* com safenas retiradas de pacientes com aterosclerose constatou que a presença do alelo 242T estava associada a uma menor produção de O_2^- devido à reduzida atividade da NAD(P)H oxidase vascular (Guzik *et al.*, 2000b).

No entanto, estudos de caso-controle realizados com o polimorfismo 242C>T têm obtido resultados conflitantes (Channon e Guzik, 2002). Embora o alelo T tenha sido primeiramente associado a uma menor prevalência de DAC em japoneses (Inoue *et al.*, 1998; Yokoyama *et al.*, 2000), outros autores não encontraram qualquer relação entre o polimorfismo 242C>T e a ocorrência de IAM em caucasóides (Cai *et al.*, 1999; Gardemann *et al.*, 1999; Stanger *et al.*, 2001; Mata-Balaguer *et al.*, 2004) e asiáticos (Saha *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2002). Por outro lado, um estudo prospectivo observou que o alelo 242T estava associado à progressão da aterosclerose em norte-americanos (Cahilly *et al.*, 2000). Porém, cabe ressaltar que todos estes trabalhos foram realizados em populações asiáticas, européias e norte-americanas, predominantemente em indivíduos sem DM.

Em relação à angiopatia em pacientes diabéticos, os poucos estudos realizados até o momento têm obtido resultados controversos. Em um estudo em japoneses com DM2 foi demonstrado que o genótipo CC estava associado ao risco aumentado de progressão da aterosclerose (Hayaishi-Okano *et al.*, 2003). O genótipo CC também estava associado à resistência à insulina em japoneses sem DM. No entanto, foi encontrada uma associação entre a ND e o genótipo CC em japoneses com DM2 (Matsunaga-Irie *et al.*, 2004) e com o genótipo TT em caucasóides com DM1 (Hodgkinson *et al.*, 2003). Além disso, outros autores não observaram nenhuma relação entre o polimorfismo 242C>T e a presença de RD e ND em japoneses com DM2 (Hayaishi-Okano *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2003).

1.4.8. A catalase (CAT)

Como mencionado anteriormente, a catalase (CAT) é uma enzima que catalisa a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água e é expressa em todos os tecidos de virtualmente todos os organismos aeróbicos (Halliwell e Gutteridge, 1999; Matés e Sánchez-Jiménez, 1999). A catalase encontrada em mamíferos é uma enzima composta por quatro subunidades idênticas, que ocorre em maior abundância no fígado, no rim e nos eritrócitos. Nos hepatócitos, a catalase localiza-se nos peroxissomos, enquanto nos eritrócitos ela ocorre no citoplasma (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A catalase, em conjunto com a SOD e a GPX, constitui o mecanismo primário de defesa celular contra o estresse oxidativo. A CAT pode proteger os eritrócitos contra os efeitos nocivos do H_2O_2 gerado pela auto-oxidação da hemoglobina. Como o H_2O_2 difunde rapidamente, os eritrócitos também podem proteger outros tecidos contra danos oxidativos através da “absorção” de H_2O_2 (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Diversos estudos têm demonstrado que a atividade da catalase não varia conforme o grupo étnico, o sexo (Glaser *et al.*, 1999) e a idade (Andersen *et al.*, 1997; Glaser *et al.*, 1999; Junqueira *et al.*, 2004) em indivíduos da população em geral.

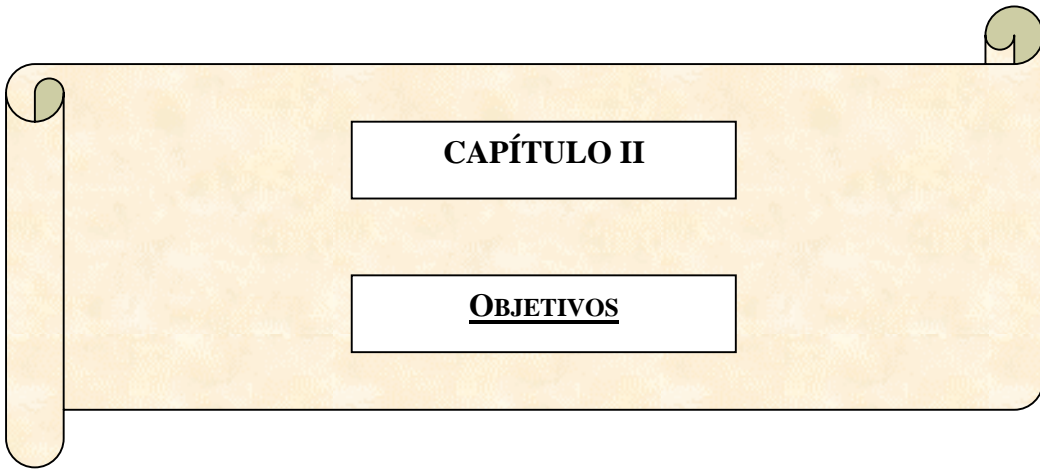
Embora a atividade da catalase não seja essencial sob condições normais, pois outras enzimas também podem degradar H₂O₂ (Ogata, 1991; Halliwell e Gutteridge, 1999), ela é considerada fundamental em condições severas de estresse oxidativo (Matés e Sánchez-Jiménez, 1999). Além da função de catalase, a CAT também apresenta função de peroxidase, no qual o H₂O₂ é utilizado para oxidar vários substratos, entre eles o metanol, o etanol, o ácido fórmico e o mercúrio (Ogata, 1991; Halliwell e Gutteridge, 1999; Matés e Sánchez-Jiménez, 1999).

A deficiência de catalase tem sido implicada na patogênese de uma série de doenças, tais como o câncer, as infecções virais e a catarata (Matés e Sánchez-Jiménez, 1999). Níveis alterados de catalase têm sido descritos em artérias coronarianas com aterosclerose (Kobayashi *et al.*, 2002), nas células sanguíneas de pacientes com DM2 (Sözmen *et al.*, 1999; Kesavulu *et al.*, 2001; Turk *et al.*, 2002; Bhatia *et al.*, 2003; Atli *et al.*, 2004), em pacientes com ND (Kedziora-Kornatowska *et al.*, 1998; Bhatia *et al.*, 2003) e após tratamento com insulina (Aydın *et al.*, 2001; Siemianowicz *et al.*, 2004), embora estes resultados não tenham sido observados por outros autores (Muchová *et al.*, 1999).

O gene da catalase (11p13) consiste de 13 exons (Quan *et al.*, 1986), e entre as diversas mutações já descritas no gene da CAT, um polimorfismo na região promotora (-262C>T) está associado aos níveis da proteína (Forsberg *et al.*, 2001b). Foi observado em suecos doadores de banco de sangue que os níveis de CAT eram significativamente maiores em indivíduos CT ou TT, em comparação aos indivíduos homocigotos para o alelo

-262C. Da mesma forma, a análise de gene repórter revelou que a construção com o alelo -262T apresenta uma expressão maior de catalase em comparação à construção com o alelo C (Forsberg *et al.*, 2001b). Assim, este polimorfismo poderia se constituir em um fator de proteção contra o estresse oxidativo.

Um estudo constatou que a frequência de DM era maior em húngaros com deficiência de catalase quando comparados aos consangüíneos em primeiro grau sem DM e à população em geral. Os autores sugeriram que a deficiência quantitativa de catalase pode predispor ao DM, devido à exposição ao acúmulo de dano oxidativo nas células β do pâncreas (Góth e Eaton, 2000). Além disso, um estudo recente de ligação identificou um loco de susceptibilidade ao DM1 no cromossomo 11p13, próximo ao gene da CAT. Por meio do estudo de caso-controle e do teste de desequilíbrio de transmissão (TDT), os autores também verificaram que o polimorfismo -262C>T estava fortemente associado à ocorrência de DM1 em russos (Chistiakov *et al.*, 2004). Até o momento, não foram realizados estudos que investigassem a relação desta variante com as complicações crônicas do DM.



2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo de caso-controle podem ser sumariados como segue:

↳ Objetivo geral: investigar o papel dos polimorfismos de DNA relacionados ao estresse oxidativo e à disfunção endotelial na patogênese das complicações crônicas do DM.

↳ Objetivos específicos:

- (1) Verificar as distribuições gênicas e genótípicas dos polimorfismos -429T>C, -374T>A e I/D 63-pb, no gene do RAGE; -106C>T, no gene da AR; -786T>C e 894G>T, no gene da eNOS; -108T>C e Q192R, no gene da PON1; S311C, no gene da PON2; 242C>T no gene CYBA; e -262C>T, no gene da CAT, em indivíduos da população em geral e em pacientes com DM2, diferenciados em caucasóides e negróides.
- (2) Analisar a associação entre os polimorfismos -429T>C, -374T>A e I/D 63-pb, no gene do RAGE; -106C>T, no gene da AR; -786T>C e 894G>T, no gene da eNOS; -108T>C e Q192R, no gene da PON1; S311C, no gene da PON2; 242C>T no gene CYBA; e -262C>T, no gene da CAT, e a ocorrência e/ou a severidade da RD, ND e CI em pacientes com DM2.

- (3) Avaliar a associação entre os haplótipos dos polimorfismos nos genes do RAGE, da eNOS, da PON1 e da PON2 e a presença e/ou a severidade da RD, ND e CI.

- (4) Verificar o efeito da interação entre os polimorfismos acima mencionados e as variáveis demográficas e metabólicas no risco de desenvolvimento da RD, ND e CI.

CAPÍTULO III

**“THE -374A ALLELE OF THE RECEPTOR FOR
ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS (RAGE) GENE
IS ASSOCIATED WITH A DECREASED RISK OF
ISCHEMIC HEART DISEASE IN
AFRICAN-BRAZILIANS WITH TYPE 2 DIABETES”**

Molecular and Genetics Metabolism (2005)

“in press”

The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene is associated with a decreased risk of ischemic heart disease in African-Brazilians with type 2 diabetes

Kátia Gonçalves dos Santos^a, Luís Henrique Canani^b, Jorge Luiz Gross^b, Balduino Tschiedel^c, Kátia Elisabete Pires Souto^c, Israel Roisenberg^{a,*}

^a *Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

^b *Endocrinology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil*

^c *Endocrinology Division, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil*

* Corresponding author: Israel Roisenberg, PhD, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caixa Postal 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel.: +55-51-3316-6736; Fax: +55-51-3316-7311. *E-mail address:* israberg@ufrgs.br

Abstract

Three functional polymorphisms described in the promoter of receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene were shown to have a marked effect on transcriptional activity. The few studies which analyzed the relationship between these three polymorphisms and the diabetic complications have shown conflicting results. In this case-control study, we evaluated the association between the $-429T>C$, the $-374T>A$ and the 63-bp insertion/deletion (I/D) polymorphisms in the RAGE gene, and the presence of diabetic retinopathy, diabetic nephropathy and ischemic heart disease, in 703 Brazilians with type 2 diabetes (520 Caucasian- and 183 African-Brazilians). Patients underwent a clinical and laboratory evaluation consisting of a questionnaire, physical examination, assessment of diabetic complications and blood collection. Genotype analysis was performed using the polymerase chain reaction and allele-specific restriction. Logistic regression analyses were used to examine associations between the clinical and genetic variables and the presence of diabetic complications. No association between the $-429C$, the $-374A$ and the 63-bp D alleles and diabetic retinopathy, diabetic nephropathy or ischemic heart disease was observed in Caucasian-Brazilians with type 2 diabetes. However, the $-374A$ allele was associated with a decreased risk of having ischemic heart disease in African-Brazilian type 2 diabetic patients [odds ratio (OR) = 0.35; 95% confidence interval (CI) = 0.15-0.81; $P = 0.014$], independently of other risk factors associated with this complication. Thus, our results show that the $-374A$ allele ($-374T>A$ polymorphism) in the RAGE gene is related to the susceptibility of developing ischemic heart disease in African-Brazilians with type 2 diabetes.

Keywords: Brazilians; Diabetic nephropathy; Diabetic retinopathy; Ischemic heart disease; Polymorphism; RAGE; Type 2 diabetes

Introduction

Diabetic retinopathy (DR), diabetic nephropathy (DN) and cardiovascular disease are frequent chronic complications of type 2 diabetes. DR is the leading cause of acquired blindness [1] and DN is the main cause of end-stage renal disease [2] in Western countries. Patients with type 2 diabetes are 2 to 4 times more likely than their nondiabetic counterparts to have cardiovascular disease, especially ischemic heart disease (IHD) [3,4].

Although both severity and duration of diabetes are strong determinants of diabetic complications, the etiology of these complications seems to be multifactorial, with an interplay between environmental and genetic risk factors [5-7].

In vivo and *in vitro* studies have shown that the advanced glycation end products (AGEs) play an important role in the pathogenesis of diabetic vascular complications [8,9]. Irreversible AGEs are known to form and accumulate in target tissues at an accelerated rate in patients with diabetes as a result of hyperglycemia. AGEs cause a plethora of deleterious effects [8,9], which are mediated by cellular receptors, in particular, the receptor for AGEs (RAGE) [10,11]. RAGE is normally expressed at low levels in the vasculature and it functions to bind and internalize low levels of AGE for degradation. However, in diabetes, the sustained interaction with higher levels of AGEs increases receptor expression and activation of proinflammatory and procoagulant pathways leading to vascular dysfunction [10,11].

Variants of the RAGE gene could alter this pathway of events by altering RAGE expression, then affecting disease development. The gene for RAGE (6p21.3) has 11 exons [12] and encodes a protein of 404 aminoacids [13]. Most of the several polymorphisms that have been identified in the RAGE gene are rare coding changes or located in noncoding

regions [14]. Three functional polymorphisms recently described in the promoter of RAGE gene, namely, $-429T>C$, $-374T>A$, and a 63-bp deletion spanning from -407 to -345 nucleotides, were highlighted as being involved in the pathogenesis of diabetic complications, because they were shown to have a marked effect on transcriptional activity [15]. However, the few studies which analyzed the relationship between these three polymorphisms and the diabetic complications have shown conflicting results [15-20].

The aim of this study was to evaluate the association between the $-429T>C$, the $-374T>A$ and the 63-bp I/D polymorphisms in the RAGE gene, and the presence of diabetic retinopathy, diabetic nephropathy and ischemic heart disease in Brazilians with type 2 diabetes.

Materials and methods

Study population

A case-control study was carried out on 703 unrelated patients with type 2 diabetes (520 Caucasian-Brazilians and 183 African-Brazilians) participating in a multicentric study in the Brazilian State of Rio Grande do Sul. Type 2 diabetes was diagnosed according to the American Diabetes Association criteria [21]. The patients were defined as case or control subjects according to the presence or absence of DR, DN and ischemic heart disease. The complications were analyzed separately, so the number of cases and controls varied according to the complications evaluated. Additionally, subjects in the control groups were required to have had diabetes for at least 10 years to be included in the study.

The Caucasian-Brazilian sample consisted of subjects who were descended from Europeans, mainly from Portugal, Spain, Italy, and Germany, whereas African-Brazilians were descendants of people brought to Brazil, between the 17th and 19th centuries, mainly from the west coast of Africa, Angola, and Mozambique.

Patients [394 female, 309 male; age 60.3 ± 10.0 (mean \pm S.D.); aged between 28 and 89 years; mean duration of diabetes 14.4 ± 8.1 years] underwent a standardized clinical and laboratory evaluation that consisted of a questionnaire, physical examination, and blood collection. Weight and height were used to calculate body mass index (BMI) (kg/m^2). Blood pressure was measured after a 5-min rest in the sitting position using a standard mercury sphygmomanometer. Hypertension was defined as blood pressure levels $\geq 140/90$ mmHg, or if the patient was on treatment with antihypertensive medication [22].

All patients participating in this study gave their written informed consent, the protocol for which was approved by all hospital ethics committees.

Assessment of diabetic complications

Assessment of DR was performed by ophthalmoscopic examination through dilated pupils, and fluorescein angiography was obtained when indicated. Diabetic retinopathy was graded as: absent, non-proliferative (microaneurysms, hard exudates, retinal hemorrhages, intraretinal microvascular abnormalities), or proliferative (new vessels within one disc diameter of the disc and/or new vessels originating elsewhere).

Regarding the presence of DN, the diagnosis was based on the albumin excretion rate (AER) in at least two of three consecutive 24-h timed or random spot sterile urine collections. Patients were classified as having normoalbuminuria (AER <20 µg/min or <17 mg/l), incipient DN (microalbuminuria) (AER 20-199 µg/min or 17-174 mg/l), or overt DN. Overt DN was defined by the presence of macroalbuminuria (AER ≥200 µg/min or >174 mg/l) or by the presence of chronic renal failure treated by dialysis when other causes of proteinuria or renal disease were ruled out.

Ischemic heart disease (IHD) was diagnosed on the presence of angina or possible myocardial infarction according to the WHO Cardiovascular Questionnaire [23], and/or on the presence of resting electrocardiogram abnormalities [Minnesota Code: Q and QS patterns (1.1-2, 1.3); S-T junction (J) and segment depression (4.1-4); T-wave items (5.1-3) and complete left bundle branch block (7.1)] [24], and/or on the presence of perfusion abnormalities (fixed or variable) upon myocardial scintigraphy at rest and after dipyridamole administration. Patients with any alteration in the above evaluation were

considered to have IHD. The demographic and clinical characteristics of the type 2 diabetic patients according to the presence or absence of IHD are shown in Table 1.

Biochemical measurements

Glycated hemoglobin was measured using standardized assays (reference range: 4.7-6.0%). Serum creatinine concentrations were determined by Jaffé's reaction and urinary albumin concentration by immunoturbidimetry (Sera-Pak immuno microalbuminuria; Bayer, Tarrytown, USA). Total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were measured by standard enzymatic methods.

Genotyping of RAGE polymorphisms

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by a salting-out procedure [25]. DNA was amplified by the polymerase chain reaction using the primers and conditions as previously described [15]. For the -429T>C and -374T>A polymorphisms, the amplification products were digested with the appropriate restriction enzymes under the conditions recommended by the manufacturer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot., Germany). The digested fragments were separated by electrophoresis on 6% polyacrilamide gels and the 63-bp I/D PCR products were run on 1.3% agarose gels, followed by ethidium bromide staining, and direct visualization under ultraviolet light.

As the -374T>A polymorphism is within the region where the 63-bp deletion occurs, the ID heterozygotes cannot be homozygotes or heterozygotes for the -374T>A

polymorphism. These subjects can only have the T or the A allele in the –374 nucleotide site [15], so they were defined as having the Tdel or the Adel genotype.

Statistical analysis

Comparisons between groups were made using the unpaired Student's *t* test for normally distributed variables, or the Mann-Whitney *U* test for variables with a skewed distribution, using the SPSS package (SPSS for Windows, version 10.0).

Allele frequencies were determined by gene counting, and departures from the Hardy-Weinberg equilibrium were verified using the χ^2 test. Allele and genotype distributions among groups of subjects were evaluated using the χ^2 test or Fisher's exact test, whichever appropriate, using PEPI program [26]. Haplotypes were estimated using the ARLEQUIN software [27]. The pairwise linkage disequilibrium (LD) was calculated according to the Lewontin formulae [28] and it was expressed in terms of D' . A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

Multivariate logistic regression analysis was used to control for independent risk factors associated with DR, DN or IHD, whenever a statistically significant association was found in the univariate analyses, using the SPSS package.

Results

Polymorphism distribution in type 2 diabetic patients

The genotype and the allele distributions of the three RAGE polymorphisms analyzed in this study are shown in Table 2. The genotype frequencies were in agreement with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium for all polymorphisms in both ethnic groups. The allele and genotype frequencies for the -374T>A and the 63-bp I/D polymorphisms in Caucasian-Brazilians were significantly different from those of African-Brazilians ($P < 0.04$).

Complete linkage disequilibrium (LD) was observed between the -429T>C and the -374T>A polymorphisms in both ethnic groups ($D' = -1$; $P < 0.006$), and the -429C/-374A haplotype was not found.

RAGE polymorphisms and diabetic complications in Caucasian-Brazilians

Four hundred and seventy-six Caucasian patients were evaluated for DR [164 without DR, 162 with non-proliferative DR (NPDR) and 150 with proliferative DR (PDR)], whereas 453 patients had their renal status evaluated (195 normo-, 119 micro- and 139 macroalbuminurics or in dialysis).

There were no differences in allele frequencies between diabetic subjects with (-429 T 87%, C 13%; -374 T 69%, A 31%; 63-bp I 98%, D 2%) or without (-429 T 90%, C 10%; -374 T 70%, A 30%; 63-bp I 99%, D 1%) DR ($P > 0.05$). Likewise, the allele frequencies in patients with DN (-429 T 87%, C 13%; -374 T 68%, A 32%; 63-bp I 98%, D 2%) were

not significantly different from those of diabetic subjects without DN (-429 T 89%, C 11%; -374 T 71%, A 29%; 63-bp I 98%, D 2%) ($P > 0.05$). Even when the comparisons between extreme phenotypes were made, e.g. normoalbuminuria vs. macroalbuminuria or absence of retinopathy vs. proliferative DR, no significant differences in the genotype and allele frequencies were found (data not shown).

The ischemic heart disease sample consisted of 346 patients (177 with and 169 without IHD). There were no differences in allele frequencies between subjects with (-429 T 87%, C 13%; -374 T 71%, A 29%; 63-bp I 99%, D 1%) or without (-429 T 89%, C 11%; -374 T 69%, A 31%; 63-bp I 98%, D 2%) IHD ($P > 0.05$).

RAGE polymorphisms and diabetic complications in African-Brazilians

Of the 172 patients who underwent the ophthalmoscopic examination, 63 did not show any signs of DR, while another 63 had NPDR and 46 had PDR. Nephropathy was present in 96 patients (44 micro- and 52 macroalbuminurics or in dialysis).

Table 3 shows the -429T>C polymorphism distribution among African-Brazilian patients according to diabetic complications. There were no significant differences in the C allele frequency between the cases and the control groups, for all complications. However, the risk of having IHD was higher for heterozygotes or CC homozygotes compared to TT homozygotes.

The frequency of the -374A allele was similar among patients with a moderate degree of DR (NPDR) or without DR (26% and 28%, respectively). However, when data from subjects without PDR (PDR⁻) were compared to patients with PDR, the -374A allele revealed to be associated with the progression to PDR, under a dominant model (Table 4).

There was also a significant association between the -374A allele and IHD, with those subjects with IHD having a lower prevalence of the A allele. In relation to DN, there were no significant differences in the allele and genotype frequencies between the cases and the control groups.

The 63-bp D allele was not associated with any of the three complications studied (the D allele varied from 4% to 6% in the different subgroups).

Multivariate logistic regression analysis and the diabetic complications in African-Brazilians

When multivariate logistic regression analysis was performed, using gender, smoking, systolic blood pressure, BMI, glycated hemoglobin, serum creatinine, HDL cholesterol, and presence of IHD as independent risk factors, and the presence of PDR (vs. non-PDR) as the dependent variable, the carriership of the TA + AA + Adel genotypes was no longer associated with a decreased risk of having PDR (OR = 0.93; 95% CI = 0.23-3.71; $P = 0.913$).

On the other hand, when multivariate logistic regression analysis was done to control for independent variables associated with the presence of IHD, the -374A allele remained as an independent factor associated with a decreased risk of having IHD (Table 5). However, the carriership of the TC + CC genotypes (-429T>C polymorphism) was no longer associated with this complication (OR = 2.86; 95% CI = 0.87-9.44; $P = 0.085$).

Next, we sought to investigate whether a specific haplotype would be associated with the diabetic complications. A lower frequency of the -429T/-374A haplotype was found in African-Brazilians with IHD ($n = 22$) compared to patients without this complication ($n =$

30) (29% vs. 54%), while the -429T/-374T and the -429C/-374T haplotypes were more frequent among patients with IHD ($n = 53$) than in those without it ($n = 26$) (71% vs. 46%, $P = 0.009$). In fact, the carriership of the -429T/-374A haplotype was associated with a decreased risk of having IHD (compared to patients with the 429T/-374T or the -429C/-374T haplotypes), in the multivariate logistic regression analysis (OR = 0.24; 95% CI = 0.10-0.60; $P = 0.003$).

Discussion

In the present study, no association between the -429C, the -374A and the 63-bp D alleles of the RAGE gene and DR, DN or IHD was observed in Caucasians with type 2 diabetes. Our findings are in accordance with previous observations, in which no relationship was found between the -429C or the -374A alleles and IHD [16] and DR [17,18] in type 2 diabetic patients. Excepting the study reported by Hudson et al. [15], in which a positive association between -429C allele and DR was found, the overall results seem to point to an absence of relationship between either -429T>C or -374T>A polymorphisms and diabetic complications, in type 2 diabetes. However, a study carried out on patients with type 1 diabetes has found a decreased risk of having proteinuria and cardiovascular disease among the AA homozygotes compared to patients with the TT or TA genotypes (-374T>A polymorphism) [19]. Moreover, a very recent study found that the -374AA genotype was associated with a decreased risk of coronary artery disease in non-diabetic Italians [29].

One factor that could have contributed for the discrepant results is the heterogeneity regarding the criteria of patients selection that were not mentioned in some of the studies cited above. Other possible explanation for the absence of relationship between the -429C or the -374A alleles and DR, DN or IHD in Caucasians observed in our study is that the Caucasian-Brazilians are a group composed of descendants of Europeans of several nationalities, mainly from Portugal, Spain, Italy and Germany. As the above mentioned studies were carried out on UK Caucasians [15,16], Slovenian Caucasians [17], Chinese subjects [18], Finnish Caucasians [19] and Italian Caucasians [29], the conflicting results could be due to such diverse populations surveyed to study these polymorphisms.

Apart from this, to our knowledge, this is the first study evaluating the relationship between the $-429T>C$, the $-374T>A$ and the 63-bp I/D polymorphisms and these complications in diabetic patients with African ancestry. In the preliminary analyses, we observed a higher frequency of the TC and the CC genotypes ($-429T>C$) in patients with IHD compared to patients without IHD, and a lower frequency of the A allele ($-374T>A$) among patients with proliferative DR and IHD than patients without one of these complications. After the multivariate logistic regression analysis, only the association between the $-374A$ allele and IHD remained statistically significant. Likewise, the haplotype analysis corroborated the carriership of the $-374A$ allele as a protective factor associated with a decreased risk of having IHD.

It is very likely that the association between the $-429C$ allele and IHD in the univariate analysis can be attributed to the strong LD between the $-429T>C$ and the $-374T>A$ polymorphisms. As the $-429C/-374A$ haplotype does not exist, when the $-429C$ allele is in an increased frequency, the frequency of $-374A$ allele is decreased. Then, as the frequency of $-374A$ allele was lower among patients with IHD, the $-429C$ allele was in an increased frequency in this group. So, the apparent association between the $-429C$ allele and IHD, is in fact a reflection of the relationship between the $-374A$ allele and this complication.

In relation to the decreased frequency of the $-374A$ allele among African-Brazilian patients with PDR, one should consider the coexistence of PDR and IHD. As the frequency of IHD was higher in the group of patients with PDR (78%), the $-374A$ allele was also seen to be associated with a decreased risk of PDR in the univariate analysis. However, this finding only reflected the association between the $-374A$ allele and IHD, as demonstrated in the multivariate analysis.

It might be argued that our positive findings could be due to a type I statistical error, but it does not seem to be the case, since the large study carried out on Finnish patients with type 1 diabetes has found a decreased risk of having proteinuria and cardiovascular disease among the AA homozygotes compared to patients with the TT or TA genotypes (-374T>A polymorphism) [19]. Moreover, it is worthwhile to note that the study reported by Falcone et al. [29] observed that the -374AA genotype was associated with a decreased risk of coronary artery disease with a strength of association quite similar to that obtained by us in African-Brazilians.

Although Hudson et al. [15] had observed that the -429C and -374A alleles had a marked effect on transcriptional activity, a very distinct difference in transcription factor binding was observed between the -374 T and A alleles *in vitro*, which suggests that the -374T>A polymorphism is in fact functional, and its involvement in the pathogenesis of diabetic complications biologically plausible.

In relation to the 63-bp I/D polymorphism, the frequency of heterozygotes among Caucasian-Brazilians was similar to that observed in other Caucasian populations [15,20]. As the D allele has been rare in all populations studied so far, there has been no means of evaluating its relationship with diabetic complications. Nevertheless, one previous study has investigated the association between this polymorphism and the presence of DN [20], in which the D allele was related to a decreased risk of having DN in type 2 diabetes, but not in type 1 diabetes. In the present study, no relationship between the 63-bp D allele and DR, DN or IHD was found.

It is worthwhile to note the high frequency of the D allele (63-bp I/D polymorphism) observed among African-Brazilians in our study. Since this is the first study reporting on

the 63-bp I/D polymorphism in subjects with African ancestry, we cannot elucidate the significance of this finding at the moment.

It is still a matter of controversy whether the $-429T>C$, the $-374T>A$ or the 63-bp I/D polymorphisms play a role in the pathogenesis of diabetic complications or not. Notwithstanding, in our study and in the two previous ones that found a positive association, this association was correlated to a decreased risk of developing diabetic complications [19,20]. These findings contradict those observed by Hudson et al. [15], who found an increased risk of DR among patients with the TC or CC genotypes ($-429T>C$ polymorphism), and the increased expression of RAGE gene resulting from the $-429C$, $-374A$ and 63-bp D alleles. As already discussed by Rudofsky et al. [20], this discrepancy could be explained by a differential expression of RAGE in different cell types, which would contribute to the contrasting findings between *in vitro* and *in vivo* studies.

Other possible explanation for the different results observed among the studies is that the $-429C$ and the $-374A$ alleles could be in linkage disequilibrium with an adjacent region within or nearby the RAGE gene that confers susceptibility, or protection, to diabetic complications.

Whenever an association has been detected, this association has been weak, so that the $-429T>C$, the $-374T>A$ and the 63-bp I/D polymorphisms or have no detectable effect or exert only a moderate effect on development of complications. Considering that there are few studies [15-20], and that only our study and one performed in Chinese patients [18] investigated non-Caucasian ethnic groups, it is early to define the role of RAGE polymorphisms in the pathogenesis of diabetic complications. Apart from this, the higher frequency of the 63-bp D allele observed in Brazilians with African ancestry, if confirmed

in other African derived populations, could bring up some important implications for the studies of population genetics.

In conclusion, no association between the $-429C$, the $-374A$ and the 63-bp D alleles and diabetic retinopathy, diabetic nephropathy or ischemic heart disease was observed in Caucasian-Brazilians with type 2 diabetes. However, the $-374A$ allele revealed to be associated with a decreased risk of having ischemic heart disease in African-Brazilian type 2 diabetic patients, under a dominant model. Further large and multiethnic studies should be performed to clarify whether it exists and to what extent would there be a relationship between the $-429T>C$, the $-374T>A$ and the 63-bp I/D polymorphisms and the diabetic complications.

Acknowledgments

We are thankful to Dr. Hugo Lisboa and his team for kindly providing part of the sample of diabetic patients analyzed in this study. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

References

- [1] D.S. Fong, L. Aiello, T.W. Gardner, G.L. King, G. Blankenship, J.D. Cavallerano, F.L. Ferris 3rd, R. Klein, for the American Diabetes Association, Retinopathy in diabetes, *Diabetes Care* 27 (Suppl. 1) (2004) S84-S87.
- [2] R.M. Bruno, J.L. Gross, Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6-year follow-up study, *J. Diabetes Complications* 14 (2000) 266-271.
- [3] B.E. Sobel, Effects of glycemic control and other determinants on vascular disease in type 2 diabetes, *Am. J. Med.* 113 (2002) 12S-22S.
- [4] G.F. Salles, K.V. Bloch, C.R. Cardoso, Mortality and predictors of mortality in a cohort of Brazilian type 2 diabetic patients, *Diabetes Care* 27 (2004) 1299-1305.
- [5] T.A. Chowdhury, P.H. Dyer, S. Kumar, A.H. Barnett, S.C. Bain, Genetic determinants of diabetic nephropathy, *Clin. Sci.* 96 (1999) 221-230.
- [6] B.R. Winkelmann, J. Hager, Genetic variation in coronary heart disease and myocardial infarction: methodological overview and clinical evidence, *Pharmacogenomics* 1 (2000) 73-94.
- [7] K.M. Warpeha, U. Chakravarthy, Molecular genetics of microvascular disease in diabetic retinopathy, *Eye* 17 (2003) 305-311.
- [8] R. Singh, A. Barden, T. Mori, L. Beilin, Advanced glycation end-products: a review, *Diabetologia* 44 (2001) 129-146.
- [9] H. Vlassara, M.R. Palace, Diabetes and advanced glycation endproducts, *J. Intern. Med.* 251 (2002) 87-101.

- [10] D.M. Stern, S.D. Yan, S.F. Yan, A.M. Schmidt, Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes, *Ageing Res. Rev.* 1 (2002) 1-15.
- [11] B.I. Hudson, L.G. Bucciarelli, T. Wendt, T. Sakaguchi, E. Lalla, W. Qu, Y. Lu, L. Lee, D.M. Stern, Y. Naka, R. Ramasamy, S.D. Yan, S.F. Yan, V. D'Agati, A.M. Schmidt, Blockade of receptor for advanced glycation endproducts: a new target for therapeutic intervention in diabetic complications and inflammatory disorders, *Arch. Biochem. Biophys.* 419 (2003) 80-88.
- [12] K. Sugaya, T. Fukagawa, K. Matsumoto, K. Mita, E. Takahashi, A. Ando, H. Inoko, T. Ikemura, Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3, *Genomics* 23 (1994) 408-419.
- [13] H. Yonekura, Y. Yamamoto, S. Sakurai, R.G. Petrova, M.J. Abedin, H. Li, K. Yasui, M. Takeuchi, Z. Makita, S. Takasawa, H. Okamoto, T. Watanabe, H. Yamamoto, Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury, *Biochem. J.* 370 (2003) 1097-1109.
- [14] B.I. Hudson, M.H. Stickland, P.J. Grant, Identification of polymorphisms in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene: prevalence in type 2 diabetes and ethnic groups, *Diabetes* 47 (1998) 1155-1157.
- [15] B.I. Hudson, M.H. Stickland, T.S. Futers, P.J. Grant, Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy, *Diabetes* 50 (2001) 1505-1511.

- [16] B.I. Hudson, M.H. Stickland, T.S. Futers, P.J. Grant, Study of the –429 T/C and – 374 T/A receptor for advanced glycation end products promoter polymorphisms in diabetic and nondiabetic subjects with macrovascular disease, *Diabetes Care* 24 (2001) 2004.
- [17] M.G. Petrovic, K. Steblovnik, B. Peterlin, D. Petrovic, The –429 T/C and – 374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene are not risk factors for diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes, *Klin. Monatsbl. Augenheilkd* 220 (2003) 873-876.
- [18] X. JiXiong, X. BiLin, Y. MingGong, L. ShuQin, –429T/C and –374 T/A polymorphisms of RAGE gene promoter are not associated with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes, *Diabetes Care* 26 (2003) 2696-2697.
- [19] K. Pettersson-Fernholm, C. Forsblom, B.I. Hudson, M. Perola, P.J. Grant, Groop Per-Henrik, for the FinnDiane Study Group, The functional –374 T/A RAGE gene polymorphism is associated with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients, *Diabetes* 52 (2003) 891-894.
- [20] G. Rudofsky Jr., B. Isermann, T. Schilling, S. Schiekofer, M. Andrassy, J.G. Schneider, M. Morcos, P.M. Humpert, A.A. Sayed, S. Witte, W. Renn, M. Pfohl, A. Hamann, V. Nosikov, E. Schleicher, H.U. Haring, G. Rudofsky, E. Ritz, P.P. Nawroth, A. Bierhaus, A 63bp deletion in the promoter of RAGE correlates with a decreased risk for nephropathy in patients with type 2 diabetes, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 112 (2004) 135-141.
- [21] American Diabetes Association, Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care* 20 (1997) 20 1183-1197.

- [22] Sixth Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, *Arch. Intern. Med.* 157 (1997) 2413-2445.
- [23] G.A. Rose, H. Blackburn, R.F. Gillium, R.J. Prineas, *Cardiovascular Survey Methods*, World Health Organization, Geneva, 1982.
- [24] M.O. Beck, S.P. Silveiro, R. Friedman, N. Clausell, J.L. Gross, Asymptomatic coronary artery disease is associated with cardiac autonomic neuropathy and diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients, *Diabetes Care* 22 (1999) 1745-1747.
- [25] D.K. Lahiri, J.I. Nurnberger, A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 5444.
- [26] J.H. Abramson, P.M. Gahlinger, *Computer Programs for Epidemiologic Analyses: PEPI version 4.0.* (2002) (available from: <http://www.sagebrushpress.com/pepibook.html>).
- [27] S. Schneider, D. Roessli, L. Excoffier, *Arlequin ver. 2.001*, A software for population genetics data analysis, (2000) (available from: <http://lgb.unige.ch/arlequin/>).
- [28] R.C. Lewontin, On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 120 (1988) 849-852.
- [29] C. Falcone, I. Campo, E. Emanuele, M.P. Buzzi, M. Zorzetto, I. Sbarsi I, M. Cuccia, Relationship between the -374T/A RAGE gene polymorphism and angiographic coronary artery disease, *Int. J. Mol. Med.* 14 (2004) 1061-1064.

Table 1

Clinical characteristics of 477 type 2 diabetic patients according to ischemic heart disease (IHD) status

	<u>Caucasian-Brazilians</u>		<u>African-Brazilians</u>	
	Without IHD	With IHD	Without IHD	With IHD
<i>n</i> (M/F)	169 (68/101)	177 (99/78) ^a	56 (14/42)	75 (31/44)
Age (years)	62.4 ± 9.6	61.8 ± 8.8	58.7 ± 11.3	59.5 ± 10.1
Duration of diabetes (years)	16.6 ± 7.0	16.7 ± 8.2	15.0 ± 4.3	13.9 ± 6.8
Glycated hemoglobin (%)	6.6 ± 1.9	6.6 ± 1.9	6.8 ± 2.2	6.9 ± 2.5
Hypertension (%)	82	86	77	95 ^a
BMI (kg/m ²)	28.3 ± 4.8	27.9 ± 4.2	28.6 ± 5.2	28.7 ± 5.7
Serum creatinine (μmol/l)	80 (35-849)	88 (44-1,025) ^b	73 (44-539)	88 (53-1,582) ^b
Total cholesterol (mmol/l)	5.4 ± 1.0	5.7 ± 1.2	5.5 ± 1.1	5.4 ± 1.4
HDL cholesterol (mmol/l)	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.3 ^a	1.3 ± 0.4	1.2 ± 0.4
Triglycerides (mmol/l)	1.7 (0.4-10.2)	1.9 (0.6-9.9)	1.7 (0.7-14.2)	1.6 (0.5-6.8)
Diabetic retinopathy (%)	50	65 ^a	39	72 ^a
Diabetic nephropathy (%)	40	64 ^a	42	67 ^a

Data are means ± SD, medians (range), or percentages.

^a Significance level at $P < 0.01$, for comparison between cases and controls.

^b Significance level at $P < 0.05$, for comparison between cases and controls.

Table 2

Genotype and allele distributions of RAGE polymorphisms in type 2 diabetic patients

Polymorphisms	Caucasian-Brazilians (<i>n</i> = 520)	African-Brazilians (<i>n</i> = 183)	<i>P</i> value ^a
-429T>C polymorphism^b			
-429TT (%)	401 (77.3)	141 (77.0)	
-429TC (%)	107 (20.6)	40 (21.9)	0.65
-429CC (%)	11 (2.1)	2 (1.1)	
T/C allele frequencies	0.88/0.12	0.88/0.12	0.91
-374T>A polymorphism^c			
-374TT (%)	241 (46.5)	96 (52.5)	
-374TA (%)	211 (40.7)	58 (31.7)	
-374AA (%)	48 (9.3)	13 (7.1)	0.01
-374Tdel (%)	14 (2.7)	15 (8.2)	
-374Adel (%)	4 (0.8)	1 (0.5)	
T/A allele frequencies	0.69/0.31	0.76/0.24	0.03
63-bp I/D polymorphism			
63-bp II (%)	502 (96.5)	167 (91.3)	0.01
63-bp ID (%)	18 (3.5)	16 (8.7)	
I/D allele frequencies	0.98/0.02	0.96/0.04	0.01

^a *P* values were computed by the χ^2 or Fisher's exact test.

^b Data missing from one Caucasian who could not be unambiguously genotyped.

^c Data missing from two Caucasians who could not be unambiguously genotyped.

Table 3

-429T>C genotype and allele frequencies in African-Brazilian type 2 diabetic patients according to diabetic complications

Complication (n)	TC + CC genotypes	TT genotype	Odds ratio ^a (95% CI)	T allele	C allele	P value ^b
PDR ⁺ (46)	11 (24%)	35 (76%)	1.01	0.88	0.12	
PDR ⁻ (126) ^c	30 (24%)	96 (76%)	(0.46-2.22)	0.87	0.13	>0.99
DN ⁺ (96) ^d	25 (26%)	71 (74%)	1.31	0.86	0.14	
DN ⁻ (66)	14 (21%)	52 (79%)	(0.62-2.76)	0.88	0.12	0.72
IHD ⁺ (75)	26 (35 %)	49 (65%)	2.77	0.83	0.17	
IHD ⁻ (56)	9 (16%)	47 (84%)	(1.18-6.53)	0.90	0.10	0.12

^aUnadjusted model.

^b P values were analyzed by the χ^2 test.

^c PDR⁻: without DR plus NPDR.

^d DN⁺: micro- plus overt nephropathy.

Table 4

-374T>A genotype and allele frequencies in African-Brazilian type 2 diabetic patients according to diabetic complications

Complication (n)	TA + AA + Adel genotypes	TT + Tdel genotypes	Odds ratio ^a (95% CI)	T allele	A allele	P value ^b
PDR ⁺ (46)	11 (24%)	35 (76%)	0.42	0.85	0.15	
PDR ⁻ (126) ^c	54 (43%)	72 (57%)	(0.20-0.90)	0.72	0.28	0.03
DN ⁺ (96) ^d	36 (38%)	60 (62%)	0.77	0.78	0.22	
DN ⁻ (66)	29 (44%)	37 (56%)	(0.40-1.45)	0.72	0.28	0.27
IHD ⁺ (75)	22 (29%)	53 (71%)	0.36	0.82	0.18	
IHD ⁻ (56)	30 (54%)	26 (46%)	(0.18-0.74)	0.69	0.31	0.03

^aUnadjusted model.

^b P values were analyzed by the χ^2 test.

^c PDR⁻: without DR plus NPDR.

^d DN⁺: micro- plus overt nephropathy.

Table 5

Multivariate logistic regression analysis with ischemic heart disease (IHD) and control samples in African-Brazilians^a

Variable	Odds ratio (95% CI)	<i>P</i>
Systolic blood pressure (mmHg)	1.03 (1.01-1.05)	0.007
Diabetic retinopathy	3.95 (1.74-8.98)	0.001
-374T>A polymorphism (TA + AA + Adel genotypes) ^b	0.35 (0.15-0.81)	0.014

^a Other variables included in the multivariate model were: gender, serum creatinine and TC + CC genotypes (-429T>C polymorphism).

^b Versus TT + Tdel genotypes.

CAPÍTULO IV

**“THE -106C>T POLYMORPHISM OF THE
ALDOSE REDUCTASE GENE IS ASSOCIATED WITH
MICROANGIOPATHY IN TYPE 2 DIABETES”**

**Manuscrito em preparação a ser submetido ao
periódico *Diabetes Research and Clinical Practice***

The -106C>T polymorphism of the aldose reductase gene is associated with microangiopathy in type 2 diabetes

Kátia Gonçalves dos Santos^a, MSc.; Luís Henrique Canani^b, MD; Jorge Luiz Gross^b, MD; Balduino Tschiedel^c, MD; Kátia Elisabete Pires Souto^c, MD; Israel Roisenberg^{a,*}, PhD.

^a *Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

^b *Endocrinology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil*

^c *Endocrinology Division, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil*

* Corresponding author: Israel Roisenberg, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caixa Postal 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel.: +55-51-3316-6736; Fax: +55-51-3316-7311. *E-mail address:* israberg@ufrgs.br

Grant support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

Abstract

In this study, we evaluated the relationship between diabetic retinopathy, diabetic nephropathy and ischemic heart disease, and three polymorphisms, $-106C>T$ in the aldose reductase (AR) gene, $-786T>C$ and $894G>T$ (E298D), both in the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene, in 703 Brazilians with type 2 diabetes (520 Caucasian- and 183 African-Brazilians). Genotype analysis was performed using the polymerase chain reaction and allele-specific restriction. Logistic regression analyses were used to examine associations between the clinical and genetic variables and the occurrence of diabetic complications. In Caucasian-Brazilians, the multiple logistic regression analysis revealed that the $-106CC$ genotype was associated with an increased risk of proliferative retinopathy [OR: 2.04, 95% CI 1.21-3.45, $P = 0.007$]. Among African-Brazilians, the $-106C$ allele was also associated with an increased risk of diabetic nephropathy (OR: 4.66, 95% CI 1.45-15.01, $P = 0.010$) and overt nephropathy (OR: 14.36, 95% CI 1.56-131.93, $P = 0.019$), under a dominant model, independently of other risk factors associated with these complications. No relationship between either the $-786T>C$ or the $894G>T$ polymorphisms in the eNOS gene and micro- or macrovascular complications was observed in both ethnic groups. Thus, our results show that the $-106C>T$ polymorphism in the AR gene is related to the susceptibility to diabetic microangiopathies in Brazilian type 2 diabetic patients.

Keywords: Polymorphism; AR gene; eNOS gene; Diabetic microangiopathy; Type 2 diabetes

1. Introduction

Diabetic retinopathy (DR), diabetic nephropathy (DN) and cardiovascular disease are frequent chronic complications of type 2 diabetes. DR is the leading cause of acquired blindness [1] and DN is the main cause of end-stage renal disease [2] in Western countries. Patients with type 2 diabetes are 2 to 4 times more likely than their nondiabetic counterparts to have cardiovascular disease, especially ischemic heart disease (IHD) [3,4].

The etiology of these complications seems to be multifactorial, with an interplay between environmental and genetic risk factors [5-7]. Since one study in Pima Indians suggested that one of the genes for susceptibility to DN is located on chromosome 7q35 [8], the aldose reductase (AR) and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genes, which are located in the same region, have been considered as two potential candidate genes for susceptibility to diabetic complications [8].

Aldose reductase, the first and rate-limiting enzyme of the polyol pathway, catalyzes the reduction of glucose to sorbitol. Under hyperglycemic conditions, the polyol pathway is accelerated, and the excessive accumulation of intracellular sorbitol leads to cellular metabolism disturbance, and ultimately, to cellular death [9]. Several studies have shown that the AR mRNA and protein levels in blood cells are increased in patients with microvascular complications in type 2 diabetes [10-12].

A -106C>T substitution in the basal promoter region of the AR gene has been shown to be associated with susceptibility to DN [13-16] in type 2 diabetes, but the findings regarding the occurrence of DR are conflicting [14-18]. Recently, a study using an *in vitro* gene reporter assay has found that the constructs with the -106C allele had a higher transcriptional activity when compared to those with the -106T allele [19], thus providing

further evidence that variants of the AR gene may account for the pathogenesis of diabetic microvascular complications.

Endothelium-derived nitric oxide (NO) plays a key role in the regulation of vascular tone [20]. It exerts vasoprotective effects by scavenging superoxide radicals and suppressing platelet aggregation, leukocyte adhesion and smooth muscle cell proliferation. Reduction in basal NO release may predispose to hypertension, vasospasm, and atherosclerosis. On the other hand, overproduction can also cause damage to cells and tissues, since NO increases the accumulation of reactive oxygen species, which in turn, lead to atherogenesis [20]. In the endothelium, NO is mainly synthesized by the eNOS isoform, a constitutive enzyme whose expression is regulated by several factors such as shear stress, cytokines and hormones [21].

It has been suggested that variants of the eNOS gene could modify its expression or activity [22,23], thus leading to reduced or excessive NO production, and consequently, contributing to many pathological processes. Amongst the several polymorphisms identified in the eNOS gene, two have been objects of intensive research in relation to cardiovascular diseases [22-24], namely, the $-786T>C$ substitution in the promoter region, and the $894G>T$ (E298D) missense substitution in the exon 7. The allele $-786C$ was found to be responsible for a reduction of 50% in the eNOS transcriptional activity [25]. The $-786T>C$ and the $894G>T$ polymorphisms have been found to be associated with DN [26], insulin resistance [27,28] and end-stage renal failure (ESRD) [29-31] in type 2 diabetes in some studies, but not in others [32-36].

The aim of this study was to evaluate the relationship between diabetic retinopathy, diabetic nephropathy and ischemic heart disease, and three polymorphisms, $-106C>T$ in the aldose reductase (AR) gene, $-786T>C$ and $894G>T$ (E298D), both in the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene, in Brazilians with type 2 diabetes.

2. Methods

2.1. Patients

A case-control study was carried out on 703 unrelated patients with type 2 diabetes (520 Caucasian-Brazilians and 183 African-Brazilians) participating in a multicentric study in the Brazilian State of Rio Grande do Sul. Type 2 diabetes was diagnosed according to the American Diabetes Association criteria [37]. The patients were defined as case or control subjects according to the presence or absence of DR, DN and IHD. The complications were analyzed separately, so the number of cases and controls varied according to the complications evaluated. Additionally, subjects in the control groups were required to have had diabetes for at least 10 years to be included in the study.

The Caucasian-Brazilian sample consisted of subjects who were descended from Europeans, mainly from Portugal, Spain, Italy, and Germany, whereas African-Brazilians were descendants of people brought to Brazil, between the 17th and 19th centuries, mainly from the west coast of Africa, Angola, and Mozambique.

Patients [394 female, 309 male; age 60.3 ± 10.0 (mean \pm S.D.); aged between 28 and 89 years; mean duration of diabetes 14.4 ± 8.1 years] underwent a standardized clinical and laboratory evaluation that consisted of a questionnaire, physical examination, and blood collection. Weight and height were used to calculate body mass index (BMI) (kg/m^2). Blood pressure was measured after a 5-min rest in the sitting position using a standard mercury sphygmomanometer. Hypertension was defined as blood pressure levels $\geq 140/90$ mmHg, or if the patient was on treatment with antihypertensive medication [38].

All patients participating in this study gave their written informed consent, the protocol for which was approved by all hospital ethics committees.

2.2. Assessment of diabetic complications

Assessment of DR was performed by ophthalmoscopic examination through dilated pupils, and fluorescein angiography was obtained when indicated. Diabetic retinopathy was graded as: absent, non-proliferative (microaneurysms, hard exudates, retinal hemorrhages, intraretinal microvascular abnormalities), or proliferative (new vessels within one disc diameter of the disc and/or new vessels originating elsewhere).

Regarding the presence of DN, the diagnosis was based on the albumin excretion rate (AER) in at least two of three consecutive 24-h timed or random spot sterile urine collections. Patients were classified as having normoalbuminuria (AER <20 µg/min or <17 mg/l), incipient DN (microalbuminuria) (AER 20-199 µg/min or 17-174 mg/l), or overt DN. Overt DN was defined by the presence of macroalbuminuria (AER ≥200 µg/min or >174 mg/l) or by the presence of chronic renal failure treated by dialysis when other causes of proteinuria or renal disease were ruled out.

The diagnosis of IHD was based on the presence of angina pectoris or possible acute myocardial infarction according to the World Health Organization questionnaire for cardiovascular disease [39], and/or on the presence of resting electrocardiogram abnormalities (Minnesota Code) [40] and/or on the presence of perfusion abnormalities (fixed or variable) upon myocardial scintigraphy at rest and after dipyridamole administration.

2.3. Routine laboratory tests

Glycated hemoglobin was measured using standardized assays (reference range: 4.7-6.0%). Serum creatinine concentrations were determined by Jaffé's reaction and urinary albumin concentration by immunoturbidimetry (Sera-Pak immuno microalbuminuria; Bayer, Tarrytown, USA). Total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were measured by standard enzymatic methods.

2.4. AR and eNOS polymorphisms genotyping

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by a salting-out procedure [41]. For the genotyping of the -106C>T polymorphism in the AR gene, DNA was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using the same primers and conditions as those previously described by Kao et al. [42]. However, instead of using *Bfa*I, the PCR products were digested with the *Bse*YI restriction enzyme, which recognizes the sequence C↓CCAGC (the underlined base represents the polymorphic site), according to the manufacturer's conditions (New England Biolabs Inc., Beverly, USA). In the presence of the -106T allele, the amplified fragment of 263-bp remains intact, whereas in the presence of the -106C allele, it is cleaved to yield 148- and 115-bp fragments. The digested fragments were then electrophoresed on 2% agarose gels, followed by ethidium bromide staining and direct visualization under ultraviolet light. As a positive control, part of the samples were also digested with *Bfa*I, which showed that *Bse*YI is as appropriate as *Bfa*I to analyze the -106C>T polymorphism.

For the genotyping of the -786T>C and the 894G>T polymorphisms in the eNOS gene, DNA was amplified by PCR using the primers and conditions previously described by Ordoñez et al. [43] and Shimazaki et al. [44], respectively. For both polymorphisms, the amplification products were digested with the appropriate restriction enzymes under the conditions recommended by the manufacturer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot., Germany). The digested fragments were separated by electrophoresis on 6% polyacrilamide gels, followed by ethidium bromide staining, and direct visualization under ultraviolet light.

2.5. Statistical analysis

Allele frequencies were determined by gene counting, and departures from the Hardy-Weinberg equilibrium were verified using the χ^2 test. Allele and genotype distributions among groups of subjects were evaluated using the χ^2 test or Fisher's exact test, whichever appropriate, using PEPI program [45]. Haplotypes were estimated using the ARLEQUIN software [46]. The pairwise linkage disequilibrium (LD) was calculated according to the Lewontin formulae [47] and it was expressed in terms of D' . A P value < 0.05 was considered statistically significant.

Multivariate logistic regression analysis was used to control for independent risk factors associated with DR, DN or IHD, whenever a statistically significant association was found in the univariate analyses, using the SPSS package (SPSS for Windows, version 10.0).

3. Results

3.1. Polymorphism distribution in type 2 diabetic patients

The genotype and the allele distributions of the AR and eNOS polymorphisms analyzed in this study are shown in Table 1. The genotype frequencies were not in agreement with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium for AR -106C>T polymorphism in both ethnic groups, in whom there was a lower frequency of heterozygotes than expected ($P < 0.035$). In relation to both eNOS polymorphisms, the genotype frequencies were in agreement with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium in Caucasian-Brazilians. However, there was an excess of heterozygotes for the 894G>T polymorphism ($P = 0.036$) among African-Brazilians. As can be seen in Table 1, the allele and genotype frequencies for the three polymorphisms were significantly different between Caucasian- and African-Brazilians.

A linkage disequilibrium (LD) was observed between the -786T>C and the 894G>T polymorphisms in Caucasian-Brazilians ($D' = 0.52$; $P < 0.001$), as well as in African-Brazilians ($D' = 0.88$; $P < 0.001$).

3.2. AR -106C>T polymorphism and presence of diabetic complications

Table 2 shows the genotype and allele frequencies of AR polymorphism in type 2 diabetic patients according to diabetic complications. In Caucasian-Brazilians, the genotype and the allele frequencies in patients with DR, DN or IHD were not significantly different from those without these complications. Likewise, there were no differences in

either genotype or allele frequencies for the AR polymorphism between African-Brazilian patients with or without DR or IHD.

However, the CT + CC genotypes were more frequent among those patients with DN than those who were normoalbuminurics. In fact, the multiple logistic regression analysis confirmed that the CT + CC genotypes were associated with an increased risk of DN [odds ratio (OR): 4.66, 95% CI 1.45-15.01, $P = 0.010$], even after adjustment for sex, smoking, use of insulin for diabetes treatment, serum creatinine and the presence of DR and IHD.

3.3. AR -106C>T polymorphism and severity of diabetic retinopathy and nephropathy

Table 3 gives the genotype and allele frequencies of AR -106C>T polymorphism according to severity of microangiopathy in type 2 diabetic patients.

In Caucasian-Brazilians, the -106C allele was found to be more frequent among patients with PDR and overt nephropathy than patients without or with a moderate degree of DR and DN. In fact, the multiple logistic regression analysis controlling for sex, systolic blood pressure, use of insulin for diabetes treatment and serum creatinine revealed that the -106CC genotype was independently associated with an increased risk of PDR (OR: 2.04, 95% CI 1.21-3.45, $P = 0.007$). However, in relation to overt nephropathy, the -106C allele did not remain associated with this complication after adjustment for sex, glycated hemoglobin, serum creatinine and triglyceride levels, use of insulin for diabetes treatment, and presence of hypertension, PDR and IHD (OR: 1.95, 95% CI 0.51-7.45, $P = 0.330$).

Among African-Brazilians, the -106C allele was also associated with an increased risk of overt nephropathy under a dominant model (OR: 14.36, 95% CI 1.56-131.93, $P = 0.019$), even after controlling for sex, age, systolic blood pressure, serum creatinine, HDL cholesterol, and presence of DR and IHD, in the multiple logistic regression analysis.

3.4. eNOS polymorphisms and diabetic complications

There were no differences in either genotype or allele frequencies for the $-786T>C$ and the $894G>T$ polymorphisms between Caucasian- (Table 4) and African-Brazilian (Table 5) type 2 diabetic patients with or without DR, DN or IHD.

Even when the comparisons between extreme phenotypes were made, e.g. normoalbuminuria vs. macroalbuminuria or absence of retinopathy vs. proliferative DR, no significant differences in the genotype and allele frequencies were found. In addition, the haplotype frequencies were not different between patients with or without micro- or macrovascular complications (data not shown).

In order to verify if the lack of association between eNOS polymorphisms and diabetic complications could be due to the interaction with clinical variables, such as sex and smoking, logistic regression models including interaction terms were tested. As the number of African-Brazilians was too small to have sufficient statistical power, the interaction analysis was only carried out on Caucasian-Brazilian type 2 diabetic patients. The interaction terms were not significant.

4. Discussion

In the present study, no association between the $-106C>T$ polymorphism in the AR gene and the presence of DR could be observed in both ethnic groups. However, the $-106C$ allele was found to be independently associated with the progression to proliferative DR in Caucasian-Brazilians, under a recessive model. Except for one study of Chinese patients [17], other studies have also found no relationship between the $-106C>T$ polymorphism and DR in Japanese [14], Chinese [15], Finnish [16] and Caucasian-Brazilians [18] with type 2 diabetes.

In our previous study [18], we adopted less strict criteria to select the control subjects, that is, the controls were patients without DR regardless of the duration of diabetes. One might have argued that this would underestimate any association due to inclusion of potential cases in the control group. However, in addition to increase the number of samples evaluated, the present study required that control subjects have had diabetes for at least 10 years. Moreover, we expanded the study by investigating the association of the $-106C>T$ polymorphism with the severity of DR, and by including data from another Brazilian ethnic group. The studies aforementioned did not analyze the relationship between this polymorphism and the severity of DR due to the small number of cases with PDR. So, the deleterious effect of the $-106CC$ genotype may not be crucial for the onset of DR, but it could exacerbate the retinal vessel abnormalities once they have started.

Polymorphisms of AR gene have been mostly studied in relation to DN [13-16]. Though there are still doubts in which stage of DN the $-106C>T$ polymorphism would be more important [13-16], the $-106T$ allele has consistently been found to be associated with

an increased risk of micro- and/or macroalbuminuria in British Caucasian [13], Japanese [14], Chinese [15] and Finnish [16] patients with type 2 diabetes. In the present study, the –106C allele was associated with both increased risk of having DN and the progression to overt nephropathy, under a dominant model, in African-Brazilians, but not among Caucasian-Brazilians. Taken together, these findings highlight some important issues to be addressed.

First, which of the alleles, the –106T or the –106C allele, is associated with increased risk of DN is not yet clearly defined. In type 2 diabetes, the allele –106T has been associated with DN [13-16], but we have found an increased risk of DN and overt nephropathy associated with the –106C allele, as was previously shown for DR in type 1 diabetes [42,48]. This is in accordance with a recent functional study in which constructs carrying the –106C allele presented the highest transcriptional activity of AR gene compared to the constructs carrying the –106T allele [19].

Since the LD between the –106C>T polymorphism and a dinucleotide repeat polymorphism in the promoter of the AR gene has often been observed [13,15,16,42], it is possible that a specific haplotype could be associated with the occurrence and severity of diabetic complications. In fact, in relation to the repeat polymorphism, the allele responsible for an increased or reduced susceptibility to DR and/or DN varies among studies in different ethnic groups [13,15,16,42].

Second, given the smaller number of African-Brazilians compared to Caucasian-Brazilians in our study, it might also be possible that the association between the –106C>T polymorphism and the presence and severity of DN in African-Brazilians is due to chance. However, in the study of Neamah-Allah et al. [13], the association between the –106C>T polymorphism and DN was restricted to the Caucasian cohorts, whereas there was no

association among Pima Indians. These results suggest that the relationship between the –106C>T polymorphism and diabetic complications may be population-specific.

Finally, the coexistence of diabetic complications could be another confounding factor. In the preliminary analyses, we observed a higher frequency of the CC genotype in Caucasian-Brazilian patients with PDR compared to those without PDR, and a higher frequency of the CT + CC genotypes among patients with overt nephropathy than those without it. As the frequency of PDR was higher in the group of patients with overt nephropathy (59%), the –106C allele was also seen to be associated with an increased risk of overt nephropathy in the univariate analysis. After the multivariate logistic regression analysis, only the association between the –106C>T polymorphism and PDR remained statistically significant.

Interestingly, Wang et al. [15] have found no relationship between –106C>T polymorphism neither with DR nor with DN in Chinese type 2 diabetic patients. However, an association between this polymorphism and the concomitant occurrence of DR and DN was observed. Further larger studies that allow the stratification for coexistent diabetic complications should be performed in order to determine if the –106C>T polymorphism could be a genetic risk factor for both DR and DN or for only DN.

In the present study, no association between the –786T>C and the 894G>T polymorphisms in the eNOS gene and the presence or severity of DR, DN or IHD was observed in either of the ethnic groups. Our findings are in accordance with previous observations in which no relationship was found between the –786T>C or the 894G>T polymorphisms and DR [26,27,32,35,36], DN [27,32,35] and IHD [26,27,32,33,35] in several studies in Japanese, Australian and Finnish type 2 diabetic patients. Only one study has shown an association between the 894G>T polymorphism and overt nephropathy in

Koreans [26], whereas three other studies have found an association between ESRD and the $-786T>C$ [29] and the $894G>T$ polymorphisms [30,31] in Japanese with type 2 diabetes. In contrast, one linkage study in African-American type 2 diabetic patients found no association between the $894G>T$ polymorphism and ESRD [34]. These findings suggest that polymorphisms of eNOS gene could be associated with an increased risk of progression to overt nephropathy and ESRD only among Asians.

In fact, the $-786T>C$ polymorphism seems to be functional, as the luciferase reporter assays showed that the $-786C$ allele reduces the expression of the eNOS gene by 40-50% [25,49]. In relation to the $894G>T$ polymorphism in the exon 7, as a study reported that eNOS protein with glutamate or aspartate at position 298 is differentially susceptible to the cleavage by endogenous proteases [50], this variant has been the object of several association studies [22-24]. However, other independent groups clearly demonstrated that the presence of aspartate at position 298 does not modify the expression of eNOS [30,51,52].

A population study has shown that there are marked interethnic differences in the distribution of eNOS variants and in the haplotype frequencies [53]. Therefore, the LD observed between the eNOS polymorphisms may be responsible, at least in part, for the positive association observed between the $894G>T$ polymorphism and cardiovascular diseases in some studies [22-24]. In the present study, the $-786C$ and the $894T$ alleles were more common in Caucasian- than in African-Brazilians, and both polymorphisms were in LD in both ethnic groups. However, the haplotype frequencies were not different between patients with or without micro- or macrovascular complications.

It is well known that eNOS activity is widely regulated by several factors, such as hormones and smoking [21,23]. The $-786T>C$ and the $894G>T$ polymorphisms were

found to be associated with insulin resistance in Japanese [27] and Italian [28] type 2 diabetic patients, but not in Finnish [33]. Though insulin is known to enhance the expression of the eNOS [54], studies in animal models have shown that insulin resistance may be a pathogenic factor for endothelial dysfunction through impaired eNOS activity and increased oxidative breakdown of nitric oxide [55]. So, the reduced eNOS activity caused by the insulin-resistant state in type 2 diabetes can be exacerbated by the presence of the $-786C$ allele, which in turn, reduces even more its activity.

In addition, the effect of the factors that are known to modulate the eNOS activity can be genotype-dependent, as reported for the $-786T>C$ polymorphism and cigarette smoking [56]. In the present study, no interaction between either the $-786T>C$ or the $894G>T$ polymorphisms and several other variables, such as sex and smoking, was observed in Caucasian-Brazilians, under a dominant model. However, we cannot rule out the existence of the interaction above mentioned regarding the presence of the $-786C$ and the $894T$ alleles in homozygosity. As the frequency of homozygotes for the $-786C$ and the $894T$ alleles was low, it was not possible to refine such an analysis.

In conclusion, the $-106C>T$ polymorphism in the AR gene was associated with an increased risk of proliferative retinopathy in Caucasian-Brazilians, and also with an increased risk of diabetic nephropathy and overt nephropathy in African-Brazilians with type 2 diabetes. On the other hand, no relationship between either the $-786T>C$ or the $894G>T$ polymorphisms in the eNOS gene and micro- or macrovascular complications was observed in either of the ethnic groups. Thus, our findings show that the $-106C>T$ polymorphism in the AR gene is related to the susceptibility to diabetic microangiopathies in Brazilian type 2 diabetic patients.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Hugo Lisboa and his team for kindly providing part of the sample of diabetic patients analyzed in this study.

References

- [1] D.S. Fong, L. Aiello, T.W. Gardner, G.L. King, G. Blankenship, J.D. Cavallerano, et al., for the American Diabetes Association, Retinopathy in diabetes, *Diabetes Care* 27 (Suppl. 1) (2004) S84-S87.
- [2] R.M. Bruno, J.L. Gross, Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6-year follow-up study, *J. Diabetes Complications* 14 (2000) 266-271.
- [3] B.E. Sobel, Effects of glycemic control and other determinants on vascular disease in type 2 diabetes, *Am. J. Med.* 113 (2002) 12S-22S.
- [4] G.F. Salles, K.V. Bloch, C.R. Cardoso, Mortality and predictors of mortality in a cohort of Brazilian type 2 diabetic patients, *Diabetes Care* 27 (2004) 1299-1305.
- [5] T.A. Chowdhury, P.H. Dyer, S. Kumar, A.H. Barnett, S.C. Bain, Genetic determinants of diabetic nephropathy, *Clin. Sci.* 96 (1999) 221-230.
- [6] B.R. Winkelmann, J. Hager, Genetic variation in coronary heart disease and myocardial infarction: methodological overview and clinical evidence, *Pharmacogenomics* 1 (2000) 73-94.
- [7] K.M. Warpeha, U. Chakravarthy, Molecular genetics of microvascular disease in diabetic retinopathy, *Eye* 17 (2003) 305-311.
- [8] G. Imperatore, R.L. Hanson, D.J. Pettitt, S. Kobes, P.H. Bennett, W.C. Knowler, and the Pima Indians Diabetes Genes Group, Sib-pair linkage analysis for susceptibility genes for microvascular complications among Pima Indians with type 2 diabetes, *Diabetes* 47 (1998) 821-830.
- [9] M. Brownlee, Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature* 414 (2001) 813-820.

- [10] C. Nishimura, Y. Hotta, T. Gui, A. Seko, T. Fujimaki, T. Ishikawa, et al., The level of erythrocyte aldose reductase is associated with the severity of diabetic retinopathy, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 37 (1997) 173-177.
- [11] G. Hasegawa, H. Obayashi, A. Kitamura, M. Hashimoto, H. Shigeta, N. Nakamura, et al., Increased levels of aldose reductase in peripheral mononuclear cells from type 2 diabetic patients with microangiopathy, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 45 (1999) 9-14.
- [12] H. Shimizu, K.I. Ohtani, T. Tsuchiya, N. Sato, Y. Tanaka, H. Takahashi, et al., Aldose reductase mRNA expression is associated with rapid development of diabetic microangiopathy in Japanese type 2 diabetic (T2DM) patients, *Diabet. Nutr. Metab.* 13 (2000) 75-79.
- [13] M. Neamat-Allah, S.A. Feeney, D.A. Savage, A.P. Maxwell, R.L. Hanson, W.C. Knowler, et al., Analysis of the association between diabetic nephropathy and polymorphisms in the aldose reductase gene in type 1 and type 2 diabetes mellitus, *Diabet. Med.* 18 (2001) 906-914.
- [14] T. Makiishi, S. Araki, D. Koya, S. Maeda, A. Kashiwagi, M. Haneda, C-106T polymorphism of AKR1B1 is associated with diabetic nephropathy and erythrocyte aldose reductase content in Japanese subjects with type 2 diabetes mellitus, *Am. J. Kidney Dis.* 42 (2003) 943-951.
- [15] Y. Wang, M.C. Ng, S.C. Lee, W.Y. So, P.C. Tong, C.S. Cockram, et al., Phenotypic heterogeneity and associations of two aldose reductase gene polymorphisms with nephropathy and retinopathy in type 2 diabetes, *Diabetes Care* 26 (2003) 2410-2415.
- [16] K. Sivenius, L. Niskanen, R. Voutilainen-Kaunisto, M. Laakso, M. Uusitupa, Aldose reductase gene polymorphisms and susceptibility to microvascular complications in type 2 diabetes, *Diabet. Med.* 21 (2004) 1325-1333.

- [17] Q. Li, P. Xie, J. Huang, Y. Gu, W. Zeng, H. Song, Polymorphisms and functions of the aldose reductase gene 5' regulatory region in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus, *Chin. Med. J.* 115 (2002) 209-213.
- [18] K.G. Santos, B. Tschiedel, J. Schneider, K. Souto, I. Roisenberg, Diabetic retinopathy in Euro-Brazilian type 2 diabetic patients: relationship with polymorphisms in the aldose reductase, the plasminogen activator inhibitor-1 and the methylenetetrahydrofolate reductase genes, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 61 (2003) 133-136.
- [19] B. Yang, A. Millward, A. Demaine, Functional differences between the susceptibility Z-2/C-106 and protective Z+2/T-106 promoter region polymorphisms of the aldose reductase gene may account for the association with diabetic microvascular complications, *Biochim. Biophys. Acta* 1639 (2003) 1-7.
- [20] A.J. Maxwell, Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases, *Nitric Oxide* 6 (2002) 101-124.
- [21] H. Li, T. Wallerah, U. Förstermann, Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase, *Nitric Oxide* 7 (2002) 132-147.
- [22] A.D. Hingorani, Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis, *Atherosclerosis* 154 (2000) 521-527.
- [23] X.L. Wang, J. Wang, Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease, *Mol. Genet. Metab.* 70 (2000) 241-251.
- [24] J.P. Casas, L.E. Bautista, S.E. Humphries, A.D. Hingorani, Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects, *Circulation* 109 (2004) 1359-1365.

- [25] M. Nakayama, H. Yasue, M. Yoshimura, Y. Shimasaki, K. Kugiyama, H. Ogawa, et al., T-786→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm, *Circulation* 99 (1999) 2864-2870.
- [26] Y.S. Shin, S.H. Baek, K.Y. Chang, C.W. Park, C.W. Yang, D.C. Jin, et al., Relations between eNOS Glu298Asp polymorphism and progression of diabetic nephropathy, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 65 (2004) 257-265.
- [27] K. Ohtoshi, Y. Yamasaki, S. Gorogawa, R. Hayaishi-Okano, K. Node, M. Matsuhisa, et al., Association of -786T-C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene with insulin resistance, *Diabetologia* 45 (2002) 1594-1601.
- [28] L.D. Monti, C. Barlassina, L. Citterio, E. Galluccio, C. Berzuini, E. Setola, et al., Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome, *Diabetes* 52 (2003) 1270-1275.
- [29] Y. Asakimori, N. Yorioka, Y. Taniguchi, T. Ito, S. Ogata, Y. Kyuden, et al., T(-786)→C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene influences the progression of renal disease, *Nephron* 91 (2002) 747-751.
- [30] E. Noiri, H. Satoh, J. Taguchi, S.V. Brodsky, A. Nakao, Y. Ogawa, et al., Association of eNOS Glu298Asp polymorphism with end-stage renal disease, *Hypertension* 40 (2002) 535-540.
- [31] S. Nagase, H. Suzuki, Y. Wang, S. Kikuchi, A. Hirayama, A. Ueda, et al., Association of ecNOS gene polymorphisms with end stage renal diseases, *Mol. Cell. Biochem.* 244 (2003) 113-118.
- [32] H. Cai, X. Wang, S. Colagiuri, D.E.L. Wilcken, A common Glu298→Asp (894G→T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and vascular complications in type 2 diabetes, *Diabetes Care* 21 (1998) 2195-2196.

- [33] A. Pulkkinen, L. Viitanen, A. Kareinen, S. Lehto, I. Vauhkonen, M. Laakso, Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with coronary heart disease, *J. Mol. Med.* 78 (2000) 372-379.
- [34] B.I. Freedman, H. Yu, P.J. Anderson, B.H. Roh, S.S. Rich, D.W. Bowden, Genetic analysis of nitric oxide and endothelin in end-stage renal disease, *Nephrol. Dial. Transplant.* 15 (2000) 1794-1800.
- [35] O. Ukkola, P.H. Erkkilä, M.J. Savolainen, Y.A. Kesäniemi, Lack of association between polymorphisms of catalase, copper-zinc superoxide dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus, *J. Intern. Med.* 249 (2001) 451-459.
- [36] T. Awata, T. Neda, H. Iizuka, S. Kurihara, T. Ohkubo, N. Takata, et al., Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic macular edema in type 2 diabetes, *Diabetes Care* 27 (2004) 2184-2190.
- [37] American Diabetes Association, Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care* 20 (1997) 1183-1197.
- [38] Sixth Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, *Arch. Intern. Med.* 157 (1997) 2413-2445.
- [39] G.A. Rose, H. Blackburn, R.F. Gillium, R.J. Prineas, *Cardiovascular Survey Methods*, Monograph series n°56, World Health Organization, Geneva, 1982.
- [40] Coronary Drug Project Research Group, The coronary drug project: design, methods, and baseline results, *Circulation* 47 (Suppl. 1) (1973) I1-I50.
- [41] D.K. Lahiri, J.I. Nurnberger, A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 5444.

- [42] Y.L. Kao, K. Donaghue, A. Chan, J. Knight, M. Silink, A novel polymorphism in the aldose reductase gene promoter region is strongly associated with diabetic retinopathy in adolescents with type 1 diabetes, *Diabetes* 48 (1999) 1338-1340.
- [43] A.J. Ordoñez, J.M. Carreira, A.G. Franco, L.M. Sanchez, M.V. Alvarez, E.C. Garcia, Two expressive polymorphisms on the endothelial nitric oxide synthase gene (intron4, 27 bp repeat and -786 T/C) and the venous thromboembolism, *Thromb. Res.* 99 (2000) 563-566.
- [44] Y. Shimasaki, H. Yasue, M. Yoshimura, M. Nakayama, K. Kugiyama, H. Ogawa, et al., Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction, *J. Am. Coll. Cardiol.* 31 (1998) 1506-1510.
- [45] J.H. Abramson, P.M. Gahlinger, *Computer Programs for Epidemiologic Analyses: PEPI version 4.0.* (2002) (available from: <http://www.sagebrushpress.com/pepibook.html>).
- [46] S. Schneider, D. Roessli, L. Excoffier, *Arlequin ver. 2.001*, A software for population genetics data analysis, (2000) (available from: <http://lgb.unige.ch/arlequin/>).
- [47] R.C. Lewontin, On measures of gametic disequilibrium, *Genetics* 120 (1988) 849-852.
- [48] A. Demaine, D. Cross, A. Millward, Polymorphisms of the aldose reductase gene and susceptibility to retinopathy in type 1 diabetes mellitus, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (2000) 4064-4068.
- [49] Y. Miyamoto, Y. Saito, M. Nakayama, Y. Shimasaki, T. Yoshimura, M. Yoshimura, et al., Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T→C mutation associated with coronary spastic angina, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 2629-2637.

- [50] M. Tesauro, W.C. Thompson, P. Rogliani, L. Qi, P.P. Chaudhary, J. Moss, Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 97 (2000) 2832-2835.
- [51] T.A. Fairchild, D. Fulton, J.T. Fontana, J.P. Gratton, T.J. McCabe, W.C. Sessa, Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)→Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 26674-26679.
- [52] R. Golser, A.C. Gorren, B. Mayer, K. Schmidt, Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system, *Nitric Oxide* 8 (2003) 7-14.
- [53] J.E. Tanus-Santos, M. Desai, D.A. Flockhart, Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants, *Pharmacogenetics* 11 (2001) 719-725.
- [54] B. Fisslthaler, T. Benzing, R. Busse, I. Fleming, Insulin enhances the expression of the endothelial nitric oxide synthase in native endothelial cells: a dual role for Akt and AP-1, *Nitric Oxide* 8 (2003) 253-261.
- [55] K. Shinozaki, K. Ayajiki, A. Kashiwagi, M. Masada, T. Okamura, Malfunction of vascular control in lifestyle-related diseases: mechanisms underlying endothelial dysfunction in the insulin-resistant state, *J. Pharmacol. Sci.* 96 (2004) 401-405.
- [56] J. Wang, D. Dudley, X.L. Wang, Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) e1-e4.

Table 1

Genotype and allele frequencies of eNOS and AR polymorphisms in type 2 diabetic patients

Polymorphism		Caucasian-Brazilians	African-Brazilians	<i>P</i> -value
AR -106C>T genotype				
Number		465	165	
Genotype frequency	CC	172 (37.0)	88 (53.3)	0.001
	CT	203 (43.7)	56 (34.0)	
	TT	90 (19.3)	21 (12.7)	
Allele frequency	C	547 (59)	232 (70)	< 0.001
	T	383 (41)	98 (30)	
eNOS -786T>C genotype				
Number		520	182	
Genotype frequency	TT	211 (40.6)	100 (55.0)	0.001
	TC	228 (43.8)	67 (36.8)	
	CC	81 (15.6)	15 (8.2)	
Allele frequency	T	650 (62)	267 (73)	< 0.001
	C	390 (38)	97 (27)	
eNOS 894G>T genotype				
Number		515	183	
Genotype frequency	GG	246 (47.8)	102 (55.8)	0.030
	GT	230 (44.7)	76 (41.5)	
	TT	39 (7.5)	5 (2.7)	
Allele frequency	G	722 (70)	280 (76)	0.023
	T	308 (30)	86 (24)	

Data are *n* (%).

Table 2Genotype and allele frequencies of AR polymorphism in type 2 diabetic patients according to diabetic complications^a

	-106C>T polymorphism	<u>Retinopathy</u>		<u>Nephropathy</u>		<u>Ischemic heart disease</u>	
		Without	With	Without	With	Without	With
	Number	137	287	166	234	138	160
Caucasian- Brazilian	Genotype frequency CC	52 (38.0)	103 (35.9)	66 (39.7)	85 (36.3)	55 (39.9)	65 (40.6)
	CT	55 (40.1)	132 (46.0)	68 (41.0)	106 (45.3)	55 (39.9)	69 (43.1)
	TT	30 (21.9)	52 (18.1)	32 (19.3)	43 (18.4)	28 (20.2)	26 (16.3)
	Allele frequency C	159 (58)	338 (59)	200 (60)	276 (59)	165 (60)	199 (62)
	T	115 (42)	236 (41)	132 (40)	192 (41)	111 (40)	121 (38)
	Number	55	100	57	87 ^b	48	68
African- Brazilian	Genotype frequency CC	30 (54.6)	51 (51.0)	27 (47.4)	49 (56.3)	26 (54.2)	37 (54.4)
	CT	18 (32.7)	36 (36.0)	18 (31.6)	31 (35.6)	16 (33.3)	20 (29.4)
	TT	7 (12.7)	13 (13.0)	12 (21.0)	7 (8.1)	6 (12.5)	11 (16.2)
	Allele frequency C	78 (71)	138 (69)	72 (63)	129 (74)	68 (71)	94 (69)
	T	32 (29)	62 (31)	42 (37)	45 (26)	28 (29)	42 (31)

Data are *n* (%).^a $P > 0.05$ for all comparisons, unless otherwise indicated.^b Unadjusted odds ratio (95% CI) for CT + CC vs. TT: 3.05 (1.12-8.29), $P < 0.03$.

Table 3

Genotype and allele frequencies of AR -106C>T polymorphism according to severity of microangiopathy in type 2 diabetic patients^a

Ethnic group	-106 C>T polymorphism	Proliferative retinopathy		Overt nephropathy		
		Without	With	Without	With	
Caucasian-	Number	288	136	278	122	
Brazilians	Genotype	CC	94 (32.6)	61 (44.9)	98 (35.2)	53 (43.4)
		CT	133 (46.2)	54 (39.7)	120 (43.2)	54 (44.3)
		TT	61 (21.2)	21 (15.4)	60 (21.6)	15 (12.3)
	Odds ratio (95% CI)	1.68 (1.10-2.55) ^b		1.96 (1.06-3.62) ^c		
Allele	C	321 (56)	176 (65)	316 (57)	160 (66)	
	T	255 (44)	96 (35)	240 (43)	84 (34)	
	<i>P</i> -value	0.016		0.025		
African-	Number	112	43	95	48	
Brazilians	Genotype	CC	58 (51.8)	23 (53.5)	48 (50.5)	28 (58.3)
		CT	41 (36.6)	13 (30.2)	30 (31.6)	19 (39.6)
		TT	13 (11.6)	7 (16.3)	17 (17.9)	1 (2.1)
	Odds ratio (95% CI)	1.07 (0.53-2.17) ^b		10.24 (1.32-79.36) ^c		
Allele	C	157 (70)	59 (69)	126 (66)	75 (78)	
	T	67 (30)	27 (31)	64 (34)	21 (22)	
	<i>P</i> -value	0.907		0.054		

Data are *n* (%).

^a The group without proliferative retinopathy includes patients without DR plus those with non-proliferative DR, whereas the group without macroalbuminuria includes normoalbuminuric patients plus those with microalbuminuria.

^b Unadjusted odds ratio (95% CI) for CC vs. CT + TT.

^c Unadjusted odds ratio (95% CI) for CT + CC vs. TT.

Table 4

Genotype and allele frequencies of eNOS polymorphisms in Caucasian-Brazilian type 2 diabetic patients according to diabetic complications*

Polymorphism		<u>Retinopathy</u>		<u>Nephropathy</u>		<u>Ischemic heart disease</u>	
		Without	With	Without	With	Without	With
-786T>C	Number	164	312	195	258	169	177
Genotype frequency	TT	63 (38.4)	127 (40.7)	79 (40.5)	102 (39.6)	58 (34.3)	71 (40.1)
	TC	72 (43.9)	140 (44.9)	84 (43.1)	111 (43.0)	78 (46.2)	75 (42.4)
	CC	29 (17.7)	45 (14.4)	32 (16.4)	45 (17.4)	33 (19.5)	31 (17.5)
Allele frequency	T	198 (60)	394 (63)	242 (62)	315 (61)	194 (57)	217 (61)
	C	130 (40)	230 (37)	148 (38)	201 (39)	144 (43)	137 (39)
894G>T	Number	162	310	191	257	165	176
Genotype frequency	GG	78 (48.1)	149 (48.1)	93 (48.7)	121 (47.1)	78 (47.3)	83 (47.2)
	GT	73 (45.1)	135 (43.5)	79 (41.4)	120 (46.7)	71 (43.0)	78 (44.3)
	TT	11 (6.8)	26 (8.4)	19 (9.9)	16 (6.2)	16 (9.7)	15 (8.5)
Allele frequency	G	229 (71)	433 (70)	265 (69)	362 (70)	227 (69)	244 (69)
	T	95 (29)	187 (30)	117 (31)	152 (30)	103 (31)	108 (31)

Data are *n* (%).* *P* > 0.05 for all comparisons.

Table 5

Genotype and allele frequencies of eNOS polymorphisms in African-Brazilian type 2 diabetic patients according to diabetic complications*

Polymorphism		<u>Retinopathy</u>		<u>Nephropathy</u>		<u>Ischemic heart disease</u>	
		Without	With	Without	With	Without	With
-786T>C	Number	62	109	65	95	56	74
Genotype frequency	TT	31 (50.0)	62 (56.9)	37 (56.9)	51 (53.7)	28 (50.0)	40 (54.0)
	TC	26 (41.9)	38 (34.9)	21 (32.3)	37 (38.9)	24 (42.9)	25 (33.8)
	CC	5 (8.1)	9 (8.2)	7 (10.8)	7 (7.4)	4 (7.1)	9 (12.2)
Allele frequency	T	88 (71)	162 (74)	95 (73)	139 (73)	80 (71)	105 (71)
	C	36 (29)	56 (26)	35 (27)	51 (27)	32 (29)	43 (29)
894G>T	Number	63	109	65	96	56	75
Genotype frequency	GG	37 (58.7)	59 (54.1)	40 (61.5)	49 (51.0)	28 (50.0)	41 (54.7)
	GT	25 (39.7)	46 (42.2)	24 (37.0)	44 (45.9)	27 (48.2)	31 (41.3)
	TT	1 (1.6)	4 (3.7)	1 (1.5)	3 (3.1)	1 (1.8)	3 (4.0)
Allele frequency	G	99 (79)	164 (75)	104 (80)	142 (74)	83 (74)	113 (75)
	T	27 (21)	54 (25)	26 (20)	50 (26)	29 (26)	37 (25)

Data are *n* (%).* *P* > 0.05 for all comparisons.

CAPÍTULO V

**“THE PARAOXONASE GENE
(-108)C/ARG192/SER311 HAPLOTYPE IS ASSOCIATED
WITH INCREASED SUSCEPTIBILITY TO
MICROANGIOPATHY IN AFRICAN-BRAZILIAN
TYPE 2 DIABETIC PATIENTS”**

Manuscrito submetido ao periódico

Diabetic Medicine

The paraoxonase gene (-108)C/Arg192/Ser311 haplotype is associated with increased susceptibility to microangiopathy in African-Brazilian Type 2 diabetic patients

K. G. Santos*, L. H. Canani†, J. L. Gross†, B. Tschiedel‡, K. E. P. Souto‡, I. Roisenberg*.

*Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

†Endocrinology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

‡Endocrinology Division, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence to: Israel Roisenberg, PhD, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caixa Postal 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel.: +55 51 3316-6736; Fax: +55 51 3316-7311. E-mail: israberger@ufrgs.br. E-mail of the first author: kgsantos2001@hotmail.com.

Running title PON polymorphisms and microangiopathy in Type 2 diabetic patients

Abstract

Aims To investigate whether the T(-108)C and the Gln192Arg polymorphisms in the paraoxonase 1 (PON1), and the Ser311Cys polymorphism in the paraoxonase 2 (PON2) genes are associated with diabetic retinopathy and nephropathy in Brazilian Type 2 diabetic patients.

Methods A case-control study was conducted on a total of 701 Brazilians with Type 2 diabetes (518 Caucasian- and 183 African-Brazilians), comparing those without retinopathy or nephropathy, despite having longstanding diabetes, and those with microangiopathies, for the association of polymorphisms in PON genes.

Results No association between the T(-108)C, the Gln192Arg and the Ser311Cys polymorphisms and diabetic retinopathy or nephropathy was observed in Caucasian-Brazilians with Type 2 diabetes. However, the (-108)C/Arg192/Ser311 haplotype was found to be more frequent among African-Brazilian patients with retinopathy than those without this complication (63% vs. 35%, $P = 0.001$). It was also more frequent among macroalbuminuric African-Brazilian patients than among patients with normo- or microalbuminuria (71% vs. 46%, $P = 0.006$). The multiple logistic regression analysis revealed that the (-108)C/Arg192/Ser311 haplotype was associated with an increased risk of retinopathy [odds ratio (OR) = 4.96, 95% confidence interval (CI) = 1.91-12.88, $P = 0.001$, compared to the patients carrying all other haplotypes], and macroalbuminuria (OR = 2.53, 95% CI = 1.11-5.80, $P = 0.028$), even after adjustment for other risk factors related to these complications.

Conclusions Our results suggest that the carriership of the (-108)C/Arg192/Ser311 haplotype is a genetic risk factor for diabetic retinopathy and progression of diabetic nephropathy in African-Brazilians with Type 2 diabetes mellitus.

Keywords diabetic nephropathy - diabetic retinopathy – paraoxonase – polymorphism - Type 2 diabetes

Abbreviations BMI, body mass index; CI, confidence interval; DN, diabetic nephropathy; DR, diabetic retinopathy; HDL, high-density lipoprotein; IHD, ischaemic heart disease; LD, linkage disequilibrium; LDL, low-density lipoprotein; NPDR, non-proliferative diabetic retinopathy; OR, odds ratio; PON, paraoxonase; PDR, proliferative diabetic retinopathy

Word count

a) abstract: 248

b) article: 4147

Introduction

Diabetic retinopathy (DR) is the leading cause of acquired blindness [1] and diabetic nephropathy (DN) is the main cause of end-stage renal disease [2] in western countries. Although both severity and duration of diabetes are strong determinants of diabetic complications, the aetiology of these complications seems to be multifactorial, with an interplay between environmental and genetic risk factors [3,4].

Paraoxonase 1 (PON1) is a HDL-associated serum glycoprotein that catalyzes the hydrolysis of toxic organophosphorus, lipid peroxides, nerve agents and lactones [5,6]. Therefore PON1 may play a protective role against atherosclerosis, since its ability of hydrolyzing lipid peroxides confers protection to HDL and LDL cholesterol from oxidation, through the inhibition of the formation and accumulation of lipid peroxides in the vascular tissues [5,6]. PON1 levels and/or activity are decreased in subjects with Type 2 diabetes mellitus (DM), and even more in diabetic patients with chronic complications [7-9].

The paraoxonase 2 (PON2) is an ubiquitous enzyme whose physiological role is still not fully understood. It is believed that PON2 can prevent the cell-mediated oxidative modification of LDL [5,6], thus contributing in avoiding atherosclerotic disease.

The paraoxonases 1 and 2 are members of a cluster located on chromosome 7 [10]. The T(-108)C polymorphism in the PON1 promoter region was found to be responsible for up to 25% of variation in the levels of the protein. The (-108)T-allele has been associated with lower serum PON1 activities and concentrations [5,6]. Only one study has investigated the relationship between this polymorphism and DN in Caucasians with Type 1 DM [11]. However, there are no studies reporting on the relationship between the T(-108)C polymorphism and microvascular complications in Type 2 diabetic patients.

The Gln192Arg polymorphism in the PON1 coding region has been defined as being one of the major determinants of the wide interindividual variability in PON activity. The Gln-allele is responsible for a lower paraoxonase activity, while the Arg-allele has been associated with a more atherogenic profile, in spite of a higher paraoxonase activity towards paraoxon [5,6]. A recent report observed an association between the Arg-allele and DN and DR in Japanese patients with Type 2 DM [12], but other studies have not found any relationship between this polymorphism and diabetic microangiopathy [7,13,14].

The Ser311Cys polymorphism in the PON2 coding region was first described as being associated with coronary heart disease in Asian Indians [15]. However, in relation to microangiopathy in Type 2 DM, there is only one study reporting an association between the Cys311-allele and DN [14], whereas other authors did not find any relationship between this polymorphism and DR [9,13] and DN [13].

Therefore, the aim of the present case-control study was to test for an association between the T(-108)C, the Gln192Arg and the Ser311Cys polymorphisms in the PON1 and PON2 genes, and the presence of diabetic retinopathy and diabetic nephropathy in Brazilian Type 2 diabetic patients.

Patients and Methods

Study population

A case-control study was carried out on 701 unrelated patients with Type 2 DM (518 Caucasian-Brazilians and 183 African-Brazilians) participating in a multicentric study in the Brazilian State of Rio Grande do Sul. Type 2 DM was diagnosed according to the American Diabetes Association criteria [16]. The patients were defined as cases or controls according to the presence or absence of DR and DN. The complications were analysed separately, so the number of cases and controls varied according to the complications evaluated. Additionally, subjects in the control groups were required to have had diabetes for at least 10 years to be included in the study.

The Caucasian-Brazilian sample consisted of subjects who were descended from Europeans, mainly from Portugal, Spain, Italy, and Germany, whereas African-Brazilians were descendants of people brought to Brazil, between the 17th and 19th centuries, mainly from the west coast of Africa, Angola, and Mozambique.

Patients [393 female, 308 male; age 60.3 ± 10.0 (mean \pm S.D.); aged between 28 and 89 years; mean duration of diabetes 14.4 ± 8.1 years] underwent a standardized clinical and laboratory evaluation that consisted of a questionnaire, physical examination, and blood collection. Weight and height were used to calculate body mass index (BMI) (kg/m^2). Blood pressure was measured after a 5-min rest in the sitting position using a standard mercury sphygmomanometer. Hypertension was defined as blood pressure levels $\geq 140/90$ mmHg, or if the patient was on treatment with antihypertensive medication [17]. Metabolic syndrome was defined according to the ATP III report [18].

All patients participating in this study gave their written informed consent, the protocol for which was approved by all hospital ethics committees.

Assessment of diabetic complications

Assessment of DR was performed by ophthalmoscopic examination through dilated pupils, and fluorescein angiography was obtained when indicated. Diabetic retinopathy was graded as: absent, non-proliferative (microaneurysms, hard exudates, retinal hemorrhages, intraretinal microvascular abnormalities), or proliferative (new vessels within one disc diameter of the disc and/or new vessels originating elsewhere).

Regarding the presence of DN, the diagnosis was based on the albumin excretion rate (AER) in at least two of three consecutive 24-h timed or random spot sterile urine collections. Patients were classified as having normoalbuminuria (AER <20 µg/min or <17 mg/l), incipient DN (microalbuminuria) (AER 20-199 µg/min or 17-174 mg/l), or overt DN. Overt DN was defined by the presence of macroalbuminuria (AER ≥200 µg/min or >174 mg/l) or by the presence of chronic renal failure treated by dialysis when other causes of proteinuria or renal disease were ruled out.

The diagnosis of ischaemic heart disease (IHD) was based on the presence of angina pectoris or possible acute myocardial infarction according to the World Health Organization questionnaire for cardiovascular disease [19], and/or on the presence of resting electrocardiogram abnormalities (Minnesota Code) [20] and/or on the presence of perfusion abnormalities (fixed or variable) upon myocardial scintigraphy at rest and after dipyridamole administration.

Biochemical measurements

Glycated hemoglobin was measured using standardized assays (reference range: 4.7-6.0%). Serum creatinine concentrations were determined by Jaffé's reaction and urinary albumin concentration by immunoturbidimetry (Sera-Pak immuno microalbuminuria; Bayer, Tarrytown, USA). Plasma glucose, total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were measured by standard enzymatic methods.

DNA genotyping

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by a salting-out procedure [21]. Both PON1 polymorphisms were PCR amplified with mismatched primers, as previously described [22,23]. The PON2 Ser311Cys polymorphism was determined by PCR amplification according to the conditions described elsewhere [15]. The amplified products were digested with the appropriate restriction enzymes under the conditions recommended by the manufacturer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot., Germany). The digested fragments were separated by electrophoresis on 6% polyacrilamide gels, followed by ethidium bromide staining, and direct visualization under ultraviolet light.

Statistical analysis

Allele frequencies were determined by gene counting, and departures from the Hardy-Weinberg equilibrium were verified using the χ^2 test. Allele and genotype distributions among groups of subjects were evaluated using the χ^2 test or Fisher's exact

test, whichever appropriate, using PEPI program [24]. In order to determine the gametic phase in subjects who were double or triple heterozygotes, the haplotypes were estimated using the Long software [25]. The pairwise linkage disequilibrium (LD) was calculated according to the Lewontin formulae [26] and it was expressed in terms of D' . A P value < 0.05 was considered statistically significant.

Multiple logistic regression analysis was used to control for independent risk factors associated with DR or DN, whenever a statistically significant association was found in the univariate analyses, using the SPSS package (SPSS for Windows, version 10.0).

Results

Polymorphism distribution in Type 2 diabetic patients

The genotype and the allele frequencies of the three PON polymorphisms analysed in this study are shown in Table 1. The genotype frequencies were in agreement with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium in both ethnic groups, for Gln192Arg and Ser311Cys polymorphisms. In relation to the T(-108)C polymorphism, there was a lower frequency of heterozygotes than expected among African-Brazilians (expected frequency = 45% vs. observed frequency = 35.0%, $P < 0.01$). The allele and genotype frequencies for both PON1 polymorphisms in Caucasian-Brazilians were significantly different from those of African-Brazilians ($P < 0.001$).

Linkage disequilibrium (LD) was observed among the three PON polymorphisms in Caucasian-Brazilian patients ($D' = 0.30$, $P < 0.001$, for PON1 polymorphisms; and $D' = 0.23$, $P = 0.002$, for comparison between Gln192Arg and Ser311Cys polymorphisms). Among African-Brazilian patients, both PON1 polymorphisms were in LD with each other ($D' = 0.43$, $P < 0.001$).

PON polymorphisms and microangiopathy in Caucasian-Brazilians

Four hundred and seventy-four Caucasian patients were evaluated for DR [163 without DR, 161 with non-proliferative DR (NPDR) and 150 with proliferative DR (PDR)], whereas 452 patients had their renal status evaluated (194 normo-, 119 micro- and 139 macroalbuminurics or in dialysis).

There were no differences in allele frequencies between patients with (-108 T 49%, C 51%; Gln192 65%, Arg192 35%; Ser311 80%, Cys311 20%) or without (-108 T 51%, C 49%; Gln192 67%, Arg192 33%; Ser311 80%, Cys311 20%) DR ($P > 0.63$). Likewise, the allele frequencies in patients with DN (-108 T 50%, C 50%; Gln192 63%, Arg192 37%; Ser311 79%, Cys311 21%) were not significantly different from those of diabetic subjects without DN (-108 T 49%, C 51%; Gln192 67%, Arg192 33%; Ser311 82%, Cys311 18%) ($P > 0.30$). Even when the comparisons between extreme phenotypes were made, e.g. normoalbuminuria vs. macroalbuminuria or absence of retinopathy vs. PDR, no significant differences in the genotype and allele frequencies were found (data not shown).

PON1 polymorphisms and retinopathy in African-Brazilians

Of the 172 patients who underwent the ophthalmoscopic examination, 63 did not show any signs of DR, while another 63 had NPDR and 46 had PDR. Table 2 shows the PON1 polymorphism distribution among African-Brazilian Type 2 diabetic patients according to diabetic retinopathy status. The (-108)C and the Arg192-alleles were more frequent among patients with DR than in those without this complication. Moreover, an association between both PON1 polymorphisms and DR was found, under a dominant model. However, in a multiple logistic regression analysis, controlling for sex, serum creatinine, current smoking, obesity (as defined by BMI > 30 kg/m²), and presence of IHD, the carriership of either (-108)C or Arg192-alleles was no longer associated with an increased risk of having DR [T/C+C/C vs. T/T odds ratio (OR) = 2.84, 95% confidence interval (CI) 0.99-8.16, and Gln/Arg+Arg/Arg vs. Gln/Gln OR = 1.33, 95% CI 0.50-3.50].

The frequency of the Gln192-allele among patients with a moderate degree of DR (NPDR) was not different from those without DR (52% and 44%, respectively, $P = 0.21$). However, when data from subjects without PDR were compared to patients with PDR, the Gln192Arg polymorphism revealed to be associated with the progression to PDR, under a dominant model. But again, after adjustment for sex, current smoking, fasting plasma glucose, serum creatinine, HDL cholesterol, obesity and presence of IHD, the homozygotes and heterozygotes for the Gln192-allele were no longer at increased risk of having PDR (OR = 1.43, 95% CI 0.30-6.89).

PON1 polymorphisms and nephropathy in African-Brazilians

Of the 161 who had the renal status evaluated, 96 patients presented DN (44 micro- and 52 macroalbuminurics or in dialysis). The frequency of alleles or genotypes did not differ significantly among patients with or without diabetic nephropathy (Table 3). However, the risk of having macroalbuminuria was higher for heterozygotes or homozygotes for the (-108)C-allele compared to T/T homozygotes. Again, the Arg192-allele was more frequent among patients with macroalbuminuria than the patients with normo- or microalbuminuria. The Gln192Arg polymorphism was associated with an increased risk of developing macroalbuminuria, under a dominant model. However, this relationship was not independent of other risk factors associated with the progression to macroalbuminuria, such as sex, systolic blood pressure, serum creatinine, presence of metabolic syndrome, DR and IHD (T/C+C/C vs. T/T OR = 2.67, 95% CI 0.35-20.50 and Gln/Arg+Arg/Arg vs. Gln/Gln OR = 1.29, 95% CI 0.29-5.69).

PON2 polymorphism and microangiopathy in African-Brazilians

In relation to Ser311Cys polymorphism, the genotype and allele frequencies were similar in patients with or without diabetic complications (the Cys311-allele varied from 17% to 24% in the different subgroups).

Haplotype analysis and microangiopathy in African-Brazilians

Since the PON polymorphisms were found to be in LD in type 2 diabetic patients, we investigated if a specific haplotype would be associated with DR and/or DN.

The (-108)C/Arg192/Ser311 haplotype was found to be significantly more frequent in African-Brazilian patients with DR than in those without this complication (63% vs. 35%, $P = 0.001$). It was associated with an increased risk of DR (compared to the patients carrying all other haplotypes), even after controlling for the factors associated with this complication (Table 4). In relation to DN, the same haplotype was more frequent among macroalbuminuric African-Brazilian patients than among patients with normo- or microalbuminuria (71% vs. 46%, $P = 0.006$). This haplotype was also associated with an increased risk of macroalbuminuria, even after adjustment for other risk factors related to this complication (Table 5).

Discussion

In the present study, the allele frequencies of the PON1 polymorphisms differed markedly between Caucasian- and African-Brazilians, and they are similar to those found in another Brazilian study [27] and other populations [6]. In Caucasian-Brazilians, no association between the T(-108)C, the Gln192Arg and the Ser311Cys polymorphisms and diabetic microangiopathy was observed. Our findings are in accordance with previous observations, in which no relationship was found between the occurrence of microangiopathies and either Gln192Arg [7,9,13,14] or Ser311Cys [9,13] polymorphisms, in Japanese and Caucasian Type 2 diabetic patients.

On the other hand, to our knowledge, this is the first study evaluating simultaneously the relationship between the T(-108)C, the Gln192Arg and the Ser311Cys polymorphisms and microangiopathy in diabetic patients with African ancestry. In the preliminary analyses, both PON1 polymorphisms were associated with an increased risk of DR and DN, but they were not independently related to these complications. However, the haplotype analysis revealed that the (-108)C/Arg192/Ser311 haplotype was much more frequent among diabetic patients with retinopathy and macroalbuminuria in this ethnic group than those without these complications. Likewise, the multiple logistic regression analysis demonstrated that this haplotype was independently associated with DR and progression of DN.

A very recent report has shown that there are marked population differences in haplotype frequency of PON1 haplotypes [28]. Therefore, the linkage disequilibrium observed between the PON polymorphisms may be responsible, at least in part, for the conflicting results regarding diabetic angiopathies. In line with this, our study is the first one to find clear evidence of association of a three-allele haplotype with diabetic

retinopathy and nephropathy in African-Brazilian Type 2 diabetic patients. Thus, this may help to explain why we failed to observe such an association in Caucasian-Brazilians with Type 2 DM. It could also explain why one study has shown an association between nephropathy and the Cys311-allele, while the Arg192-allele was not related to this complication [14].

It might be argued that our positive findings could be due to a type I statistical error, but it does not seem to be the case, since a very recent study has observed that the carriership of the Arg192-allele is a risk factor for DR and DN, in Japanese patients with Type 2 DM [12]. As already observed, it is noteworthy that the association of the Arg192-allele with an increased risk of vascular disease is more prominent in those populations in which this allele is prevalent, such as the African and Japanese populations [6].

The heterogeneity seen in the different studies regarding criteria of patients selection and the coexistence of diabetic complications could be some of the factors leading to the contrasting results. Considering that there are few studies [7,9,12-14], ours being the only study that has investigated Type 2 diabetic patients with African ancestry, it is early to assert the role of PON polymorphisms in the pathogenesis of diabetic complications.

In conclusion, no association between the T(-108)C, the Gln192Arg and the Ser311Cys polymorphisms and diabetic retinopathy or nephropathy was observed in Caucasian-Brazilians with Type 2 DM. However, the (-108)C/Arg192/Ser311 haplotype revealed to be associated with an increased susceptibility to diabetic retinopathy and progression to macroalbuminuria in African-Brazilian type 2 diabetic patients. Further large and multiethnic studies should be performed to clarify whether the polymorphisms in the PON genes are related to the diabetic microangiopathies.

Acknowledgments

We are thankful to Dr. Hugo Lisboa and his team for kindly providing part of the sample of diabetic patients analysed in this study. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

References

1. Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD *et al.* Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004; **27**: S84-S87.
2. Bruno RM, Gross JL. Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6-year follow-up study. *J Diabetes Complications* 2000; **14**: 266-271.
3. Chowdhury TA, Dyer PH, Kumar S, Barnett AH, Bain SC. Genetic determinants of diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)* 1999; **96**: 221-230.
4. Warpeha KM, Chakravarthy U. Molecular genetics of microvascular disease in diabetic retinopathy. *Eye* 2003; **17**: 305-311.
5. Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med* 2003; **81**: 766-779.
6. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004; **369**: 78-88.
7. Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, Nakauchi Y, Morita T, Arai K *et al.* Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998; **47**: 598-602.
8. Inoue M, Suehiro T, Nakamura T, Ikeda Y, Kumon Y, Hashimoto K. Serum arylesterase/diazoxonase activity and genetic polymorphisms in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2000; **49**: 1400-1405.
9. Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJM, Mackness MI. Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci (London)* 2000; **98**: 355-363.

10. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33: 498-507.
11. Araki S, Makita Y, Canani L, Ng D, Warram JH, Krolewski AS. Polymorphisms of human paraoxonase 1 gene (PON1) and susceptibility to diabetic nephropathy in type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000; **43**: 1540-1543.
12. Murata M, Maruyama T, Suzuki Y, Saruta T, Ikeda Y. Paraoxonase 1 ¹⁹²Gln/Arg polymorphism is associated with the risk of microangiopathy in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2004; **21**: 837-844.
13. Letellier C, Durou MR, Jouanolle AM, Le Gall JY, Poirier JY, Ruelland A. Serum paraoxonase activity and paraoxonase gene polymorphism in type 2 diabetic patients with or without vascular complications. *Diabetes Metab (Paris)* 2002; **28**: 297-304.
14. Pinizzotto M, Castillo E, Fiaux M, Temler E, Gaillard RC, Ruiz J. Paraoxonase2 polymorphisms are associated with nephropathy in type II diabetes. *Diabetologia* 2001; **44**: 104-107.
15. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 1998; **62**: 36-44.
16. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997; **20**: 1183-1197.
17. Sixth Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Arch Intern Med* 1997; **157**: 2413-2445.
18. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education

- Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; **285**: 2486-2497.
19. Rose GA, Blackburn H, Gillium RF, Prineas RJ. *Cardiovascular Survey Methods*, 2nd edn. Geneva: World Health Organization 1982.
 20. Coronary Drug Project Research Group. The coronary drug project: design, methods, and baseline results. *Circulation* 1973; **47**: 11-150.
 21. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 5444.
 22. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 1428-1436.
 23. Motti C, Dessi M, Gnasso A, Irace C, Indigeno P, Angelucci CB *et al.* A multiplex PCR-based DNA assay for the detection of paraoxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis* 2001; **158**: 35-40.
 24. Abramson JH, Gahlinger PM. 2002. Computer Programs for Epidemiologic Analyses: PEPI version 4.0. (available from: <http://www.sagebrushpress.com/pepibook.html>).
 25. Long JC. 1999. Multiple Locus Haplotype Analysis, version 2.0. Software and documentation distributed by the author. Section on Population Genetics and Linkage, Laboratory of Neurogenetics, NIAAA, National Institutes of Health, Bethesda, MD.
 26. Lewontin RC. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 1988; **120**: 849-852.
 27. Allebrandt KV, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro- and Afro-Brazilians. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; **180**: 151-156.

28. Koda Y, Tachida H, Soejima M, Takenaka O, Kimura H. Population differences in DNA sequence variation and linkage disequilibrium at the PON1 gene. *Ann Hum Genet* 2004; **68**: 110-119.

Table 1 Genotype and allele distributions of PON polymorphisms in Type 2 diabetic patients

	Caucasian-Brazilians	African-Brazilians	<i>P</i> -value
Polymorphisms	(<i>n</i> = 518)	(<i>n</i> = 183)	
T(-108)C			
T/T genotype	132 (25.5)	31 (16.9)	
T/C genotype	248 (47.9)	64 (35.0)	< 0.001
C/C genotype	138 (26.6)	88 (48.1)	
T-allele	512 (49)	126 (34)	< 0.001
C-allele	524 (51)	240 (66)	
Gln192Arg			
Gln/Gln genotype	221 (42.7)	43 (23.5)	
Gln/Arg genotype	231 (44.6)	90 (49.2)	< 0.001
Arg/Arg genotype	66 (12.7)	50 (27.3)	
Gln-allele	673 (65)	176 (48)	< 0.001
Arg-allele	363 (35)	190 (52)	
Ser311Cys*†			
Ser/Ser genotype	329 (64.3)	108 (60.3)	
Ser/Cys genotype	163 (31.8)	61 (34.1)	0.831
Cys/Cys genotype	20 (3.9)	10 (5.6)	
Ser-allele	821 (80)	277 (77)	0.292
Cys-allele	203 (20)	81 (23)	

Data are number of alleles or genotypes (% of each group).

*Data missing from six Caucasian-Brazilians who could not be unambiguously genotyped.

†Data missing from four African-Brazilians who could not be unambiguously genotyped.

Table 2 PON1 T(-108)C and Gln192Arg genotype and allele frequencies according to diabetic retinopathy status in 172 African-Brazilian Type 2 diabetic patients

Polymorphisms	Diabetic retinopathy		Proliferative DR	
	Without (<i>n</i> = 63)	With (<i>n</i> = 109)	Without* (<i>n</i> = 126)	With (<i>n</i> = 46)
T(-108)C genotype				
T/T	16 (26)	13 (12)	25 (20)	4 (9)
T/C+C/C	47 (74)	96 (88)	101 (80)	42 (91)
Odds ratio (95% CI)†	2.51 (1.12-5.66)		2.60 (0.85-7.92)	
Allele				
T	53 (42)	64 (29)	92 (37)	25 (27)
C	73 (58)	154 (71)	160 (63)	67 (73)
<i>P</i> -value	0.023		0.137	
Gln192Arg genotype				
Gln/Gln	22 (35)	18 (17)	37 (29)	3 (6)
Gln/Arg+Arg/Arg	41 (65)	91 (83)	89 (71)	43 (94)
Odds ratio (95% CI)‡	2.71 (1.32-5.60)		5.96 (1.74-20.42)	
Allele				
Gln	71 (56)	94 (43)	131 (52)	34 (37)
Arg	55 (44)	124 (57)	121 (48)	58 (63)
<i>P</i> -value	0.024		0.019	

Data are number of alleles or genotypes (% of each group).

*The group without proliferative DR includes patients without DR plus those with non-proliferative DR.

†Crude odds ratio (95% CI) for T/C+C/C vs. T/T genotype.

‡Crude odds ratio (95% CI) for Gln/Arg+Arg/Arg vs. Gln/Gln genotype.

Table 3 PON1 T(-108)C and Gln192Arg genotype and allele frequencies according to diabetic nephropathy status in 161 African-Brazilian Type 2 diabetic patients

Polymorphisms	Diabetic nephropathy		Macroalbuminuria	
	Without (<i>n</i> = 65)	With (<i>n</i> = 96)	Without* (<i>n</i> = 109)	With (<i>n</i> = 52)
T(-108)C genotype				
T/T	13 (20)	15 (16)	24 (22)	4 (8)
T/C+C/C	52 (80)	81 (84)	85 (78)	48 (92)
Odds ratio (95% CI)†	1.32 (0.58-3.01)		3.39 (1.11-10.34)	
Allele				
T	46 (35)	67 (35)	84 (39)	29 (28)
C	84 (85)	125 (85)	134 (61)	75 (72)
<i>P</i> -value	> 0.990		0.081	
Gln192Arg genotype				
Gln/Gln	21 (32)	21 (22)	35 (32)	7 (13)
Gln/Arg+Arg/Arg	44 (68)	75 (78)	74 (68)	45 (87)
Odds ratio (95% CI)‡	1.67 (0.82-3.39)		3.04 (1.25-7.42)	
Allele				
Gln	69 (53)	90 (47)	118 (54)	41 (39)
Arg	61 (47)	102 (53)	100 (46)	63 (61)
<i>P</i> -value	0.328		0.019	

Data are number of alleles or genotypes (% of each group).

*The group without macroalbuminuria includes normoalbuminuric patients plus those with microalbuminuria.

†Crude odds ratio (95% CI) for T/C+C/C vs. T/T genotype.

‡Crude odds ratio (95% CI) for Gln/Arg+Arg/Arg vs. Gln/Gln genotype.

Table 4 Results of multivariate logistic regression analysis testing relationships between diabetic retinopathy and risk factors in African-Brazilian Type 2 diabetic patients

Risk factor	Odds ratio	95% CI	<i>P</i> -value
(-108)C/Arg192/Ser311 haplotype*	4.96	1.91-12.88	0.001
Sex (M)	4.86	1.72-13.68	0.003
Obesity (BMI > 30 kg/m ² vs. < 30 kg/m ²)	0.26	0.10-0.67	0.005
Ischaemic heart disease (yes/no)	4.15	1.72-9.97	0.001

Other variables tested in the multiple model were: serum creatinine and current smoking (vs. ex-smokers + never smokers).

*Versus all other haplotypes.

Table 5 Results of multivariate logistic regression analysis testing relationships between macroalbuminuria* and risk factors in African-Brazilian Type 2 diabetic patients

Risk factor	Odds ratio	95% CI	<i>P</i> -value
(-108)C/Arg192/Ser311 haplotype†	2.53	1.11-5.80	0.028
Serum creatinine (mmol/l)	10.41	4.65-23.31	< 0.001

Other variables tested in the multiple model were: age, sex, systolic blood pressure, presence of metabolic syndrome, diabetic retinopathy and ischaemic heart disease.

*Compared to normo- + microalbuminuria.

†Versus all other haplotypes.

CAPÍTULO VI

**“POLYMORPHISMS OF PON1 GENE ARE
ASSOCIATED WITH ISCHAEMIC HEART DISEASE IN
TYPE 2 DIABETES”**

**Manuscrito submetido ao periódico
*International Journal of Cardiology***

Polymorphisms of PON1 gene are associated with ischaemic heart disease in type 2 diabetes

Kátia G. Santos^a, MSc.; Luís H. Canani^b, MD; Jorge L. Gross^b, MD; Balduino Tschiedel^c, MD; Kátia E. P. Souto^c, MD; Israel Roisenberg^{a,*}, PhD.

^a *Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

^b *Endocrinology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil*

^c *Endocrinology Division, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil*

* Corresponding author. Israel Roisenberg, PhD, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caixa Postal 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel.: +55-51-3316-6736; Fax: +55-51-3316-7311. *E-mail address:* israberg@ufrgs.br

Grant support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

Abstract

Background: Polymorphisms of the paraoxonases 1 and 2 (PON1 and PON2) genes have been associated with atherosclerosis in some studies, but not in others. This study examined the association between the –108 T/C, the 192 Gln/Arg (PON1) and the 311 Ser/Cys (PON2) polymorphisms, and the presence of ischaemic heart disease (IHD) in 475 Brazilians with type 2 diabetes (344 Caucasian- and 131 African-Brazilians). *Methods:* Genotypes were analyzed using the PCR-RFLP method. Multiple logistic regression analysis was used to control for risk factors associated with IHD in the univariate analyses. *Results:* In African-Brazilians, the –108 T/C polymorphism was independently associated with an increased risk of IHD [odds ratio = 4.67 (95% confidence interval: 1.80-12.14), for TC+TT vs. CC genotype]. Among Caucasian-Brazilians there were no differences in distribution of the three PON polymorphisms between cases and controls in the overall population. However, an effect of interaction was detected between the –108 T/C polymorphism and age ($p=0.004$) and between the 192 Gln/Arg polymorphism and smoking ($p=0.008$) on the risk of IHD. The TC+TT genotypes were more frequent in controls than in cases ($p<0.010$), and this difference was limited to young individuals (age <54 years). Moreover, only among smokers the Gln/Arg+Arg/Arg genotypes were more prevalent in cases than in controls ($p=0.020$). *Conclusions:* The –108 T/C polymorphism of the PON1 gene is associated with IHD in African-Brazilian type 2 diabetic patients and there exists an important interaction effect of PON1 polymorphisms with individual's age and smoking status on IHD among Caucasian-Brazilian type 2 diabetic patients.

Keywords: Ischaemic heart disease; Paraoxonase; Polymorphism; Type 2 diabetes

1. Introduction

Patients with type 2 diabetes are 2 to 4 times more likely to have cardiovascular disease than their nondiabetic counterparts, especially ischaemic heart disease [1,2]. Although both severity and duration of diabetes are strong determinants of diabetic complications, the aetiology of macroangiopathy seems to be multifactorial, with an interplay between environmental and genetic risk factors [3].

Paraoxonase 1 (PON1) is a HDL-associated serum glycoprotein that catalyzes the hydrolysis of toxic organophosphorus, lipid peroxides, nerve agents and lactones [4,5]. Therefore, PON1 may play a protective role against atherosclerosis, since its ability of hydrolyzing lipid peroxides confers protection to HDL and LDL-cholesterol from oxidation through the inhibition of the formation and accumulation of lipid peroxides in the vascular tissues [4,5]. PON1 activity is decreased in subjects prone to development of atherosclerosis such as in type 2 diabetes, particularly in the presence of vascular complications [6,7].

The paraoxonase 2 (PON2) is an ubiquitous enzyme whose physiological role is still not fully understood [8]. Experimental data suggest that PON2 may reduce the production of intracellular hydroperoxides and/or cell-mediated LDL oxidation [4,5], thus contributing in avoiding atherosclerotic disease.

The paraoxonases 1 and 2 are members of a cluster located on chromosome 7 [9]. The –108 T/C polymorphism in the PON1 promoter region was found to be responsible for up to 25% of variation in the serum levels of the protein. The –108 T-allele has been associated with lower serum PON1 activities and concentrations [4,5]. Only one study has investigated the relationship between this polymorphism and coronary heart disease (CHD)

in type 2 diabetes [10], in which the -108 T-allele was found to be associated with an increased risk of this complication in Caucasian patients.

The 192 Gln/Arg polymorphism in the PON1 coding region has been defined as being one of the major determinants of the wide interindividual variability in PON1 activity. The Gln-allele is responsible for a lower paraoxonase activity towards paraoxon, while the Arg-allele has been associated with a more atherogenic profile [4,5]. Two recent meta-analyses of more than 40 case-control studies [11,12], including six studies with type 2 diabetic patients, indicate no simple relationship between the 192 Gln/Arg polymorphism and the presence of CHD. In addition, other investigations designed to evaluate macroangiopathy in Caucasians and Asians with type 2 diabetes have shown conflicting results [6,10,13-15].

The 311 Ser/Cys polymorphism in the PON2 coding region [8] was first described as being associated with CHD in Asian Indians [16], but other studies [11], including two studies in Caucasian type 2 diabetic patients have not found this association [17,18].

Therefore, the aim of the present case-control study was to examine the association between the -108 T/C, the 192 Gln/Arg and the 311 Ser/Cys polymorphisms in the PON1 and PON2 genes, and the presence of ischaemic heart disease in Brazilian type 2 diabetic patients.

2. Materials and methods

2.1. Study population

A case-control study was carried out on 475 unrelated patients with type 2 diabetes (344 Caucasian-Brazilians and 131 African-Brazilians) participating in a multicentric study in the Brazilian State of Rio Grande do Sul. Type 2 diabetes mellitus was diagnosed according to the American Diabetes Association criteria [19]. Patients with ischaemic heart disease (IHD) were defined as case subjects, and the patients without IHD with a known diabetes duration of at least 10 years were defined as control subjects.

The Caucasian-Brazilian sample consisted of subjects who were descended from Europeans, mainly from Portugal, Spain, Italy, and Germany, whereas African-Brazilians were descendants of people brought to Brazil, between the 17th and 19th centuries, mainly from the west coast of Africa, Angola, and Mozambique.

Patients [264 female, 211 male; age 61.3 ± 9.6 (mean \pm S.D.); aged between 34 and 89 years; mean duration of diabetes 16.0 ± 7.3 years] underwent a standardized clinical and laboratory evaluation that consisted of a questionnaire and physical examination. Weight and height were used to calculate body mass index (BMI) (kg/m^2). Blood pressure was measured after a 5-min rest in the sitting position using a standard mercury sphygmomanometer. Hypertension was defined as blood pressure levels $\geq 140/90$ mmHg, or if the patient was on treatment with antihypertensive medication [20]. Patients were considered to be smokers if they were former or current smokers, whereas the patients who had never smoked were defined as nonsmokers.

All patients participating in this study gave their written informed consent, the protocol for which was approved by all hospital ethics committees.

2.2. Assessment of diabetic complications

Assessment of diabetic retinopathy (DR) was performed by ophthalmoscopic examination through dilated pupils, and fluorescein angiography was obtained when indicated. Diabetic retinopathy was graded as: absent, non-proliferative (microaneurysms, hard exudates, retinal hemorrhages, intraretinal microvascular abnormalities), or proliferative (new vessels within one disc diameter of the disc and/or new vessels originating elsewhere).

Regarding the presence of diabetic nephropathy (DN), the diagnosis was based on the albumin excretion rate (AER) in at least two of three consecutive 24-h timed or random spot sterile urine collections. Patients were classified as having normoalbuminuria (AER < 20 µg/min or < 17 mg/l), incipient DN (microalbuminuria) (AER 20-199 µg/min or 17-174 mg/l), or overt DN. Overt DN was defined by the presence of macroalbuminuria (AER ≥ 200 µg/min or > 174 mg/l) or by the presence of chronic renal failure treated by dialysis when other causes of proteinuria or renal disease were ruled out.

Ischemic heart disease (IHD) was diagnosed on the presence of angina or possible myocardial infarction according to the WHO Cardiovascular Questionnaire [21], and/or on the presence of resting electrocardiogram abnormalities [Minnesota Code: Q and QS patterns (1.1-2, 1.3); S-T junction (J) and segment depression (4.1-4); T-wave items (5.1-3) and complete left bundle branch block (7.1)] [22], and/or on the presence of perfusion abnormalities (fixed or variable) upon myocardial scintigraphy at rest and after

dipyridamole administration. Patients with any alteration in the above evaluation were considered to have IHD.

2.3. Biochemical analysis

Glycated hemoglobin was measured using standardized assays (reference range: 4.7-6.0%). Serum creatinine concentrations were determined by Jaffé's reaction and urinary albumin concentration by immunoturbidimetry (Sera-Pak immuno microalbuminuria; Bayer, Tarrytown, USA). Total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides (TG) were measured by standard enzymatic methods. LDL-cholesterol was calculated using the Friedewald's formula: $LDL = \text{total cholesterol} - [\text{HDL} + (\text{TG}/5)]$.

2.4. Genotyping of PON polymorphisms

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by a salting-out procedure [23]. Both PON1 polymorphisms were PCR amplified with mismatched primers as previously described [24,25]. The PON2 311 Ser/Cys polymorphism was determined by PCR amplification according to the conditions described elsewhere [16]. The amplified products were digested with the appropriate restriction enzymes under the conditions recommended by the manufacturer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot., Germany). The digested fragments were separated by electrophoresis on 6% polyacrilamide gels, followed by ethidium bromide staining, and direct visualization under ultraviolet light.

2.5. Statistical analysis

Comparisons between groups were made using the unpaired Student's *t* test and one-way analysis of variance (ANOVA) for normally distributed variables, or the Mann-Whitney *U* test and Kruskal-Wallis test for variables with a skewed distribution, using the SPSS package (SPSS for Windows, version 10.0).

Allele frequencies were determined by gene counting, and departures from the Hardy-Weinberg equilibrium were verified using the χ^2 test. Allele and genotype distributions among groups of subjects were evaluated using the χ^2 test or Fisher's exact test, whichever appropriate, using PEPI program [26]. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

Multiple logistic regression analysis was also carried out on SPSS 10.0. It was used to control for independent risk factors associated with IHD in the univariate analyses, and to assess the effects of the interactions between the PON polymorphisms and gender, age, systolic blood pressure, body mass index, smoking and lipoprotein variables on the susceptibility to IHD.

3. Results

Caucasian-Brazilians with IHD ($n = 176$) were more often men (56% vs. 40%), current smokers (20% vs. 10%), and were more likely to have lower levels of HDL-cholesterol (1.09 mmol/l vs. 1.16 mmol/l), a higher prevalence of retinopathy (65% vs. 50%) and nephropathy (64% vs. 40%) than subjects without IHD ($n = 168$) ($p < 0.015$ for all comparisons). Among African-Brazilians, the cases ($n = 75$) were more likely to have hypertension (95% vs. 77%), higher levels of systolic blood pressure (152 mmHg vs. 140 mmHg), retinopathy (72% vs. 39%) and nephropathy (67% vs. 42%) than controls ($n = 56$) ($p < 0.008$ for all comparisons). Age, BMI, glycated hemoglobin, total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides were not different between cases and controls, in either of the ethnic groups ($p > 0.05$ for all comparisons).

The allele frequencies for both PON1 polymorphisms in Caucasian-Brazilians were significantly different from those of African-Brazilians (-108T = 50% vs. 36%; $p < 0.001$; 192Arg = 34% vs. 51%; $p < 0.001$), while the frequency of 311 Cys-allele (PON2 polymorphism) was almost identical (20% vs. 19%; $p = 0.784$). The genotype frequencies were in agreement with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium for the three PON polymorphisms analyzed in this study in Caucasian-Brazilians as well as in African-Brazilians except for -108 T/C polymorphism among African-Brazilians. For this polymorphism there was a lower frequency of heterozygotes than expected ($p < 0.010$).

Table 1 gives the genotype and allele distribution of the PON polymorphisms in Brazilian type 2 diabetic patients according to presence or absence of IHD. In Caucasian-Brazilians there were no differences in genotype and allele frequencies for the three PON polymorphisms between subjects with or without IHD. However, among African-

Brazilians the genotype frequencies differed between cases and controls for the PON2 polymorphism. As there were only five homozygous subjects for the 311 Cys-allele, it was not possible to assess the meaning of this result. In addition, the -108 T-allele of PON1 promoter polymorphism was more prevalent among patients with IHD than those without it, as were the TT + TC genotypes (62.7% vs. 41.1%; $p = 0.023$).

As can be seen in Table 2, the -108 T/C polymorphism remained as an independent factor associated with an increased risk of having IHD, under a dominant model, even after adjustment for other clinical variables.

In order to verify if the -108 T/C, the 192 Gln/Arg and the 311 Ser/Cys polymorphisms could interact with demographic and clinical variables in the susceptibility to ischaemic heart disease, logistic regression models including interaction terms were tested. As the number of African-Brazilians was too small to have sufficient statistical power, the interaction analysis was only carried out on Caucasian-Brazilian type 2 diabetic patients.

Table 3 shows that two significant interaction effects on the risk of IHD were observed in Caucasian-Brazilians: the -108 T/C polymorphism interacts with age ($p = 0.004$), whereas the 192 Gln/Arg polymorphism interacts with smoking status ($p = 0.008$). The TC + TT genotypes (PON1 promoter polymorphism) were more frequent in type 2 diabetic patients without IHD than those who have this complication (86.7% vs. 50.0%; $p < 0.010$), and this difference was limited to young individuals (age < 54 years). In relation to the PON1 192 Gln/Arg polymorphism, Table 4 shows that the Gln/Arg + Arg/Arg genotypes were significantly more prevalent in cases than in controls, only among smokers.

Interaction between PON polymorphisms were not significant. In relation to lipoprotein variables, neither there were significant interaction effects, nor the PON polymorphisms were consistently related to lipoprotein levels (data not shown), except among Caucasian-Brazilians, in whom the homozygotes for the 192 Arg-allele (192Gln/Arg polymorphism) displayed higher HDL-cholesterol levels than subjects who were Gln/Gln homozygotes (1.16 mmol/l vs. 1.06 mmol/l; $p = 0.039$).

4. Discussion

One recent meta-analysis found no evidence that the –108 T/C and the 311 Ser/Cys polymorphisms in PON genes are associated with CHD risk. However, the authors observed a weakly positive overall association between the PON1 192 Gln/Arg polymorphism and CHD, whose relevance remains uncertain [11]. Another meta-analysis of the PON1 Gln/Arg polymorphism, including three additional studies, did not find any relationship between this polymorphism and CHD [12]. Moreover, those findings are mostly based on North-American, European and Asian populations. However, it has been suggested that susceptibility genes for atherosclerotic disease may differ in different ethnic groups [12] and in the absence or presence of type 2 diabetes [15,27].

The only other study which assessed the relationship between the PON1 –108 T/C polymorphism and CHD on predominantly type 2 diabetic patients observed that the –108 T-allele was independently associated with this complication in Caucasians [10]. In the present study, the –108 T-allele was also found to be independently associated with an increased risk of IHD among African-Brazilians with type 2 diabetes, under a dominant model. However, the PON1 192 Gln/Arg and the PON2 311 Ser/Cys polymorphisms were not related to IHD in this ethnic group. Three studies involving mainly nondiabetic subjects with African ancestry found no relationship between either the 192 Gln/Arg [28-30] or the 311 Ser/Cys [28,29] polymorphisms and coronary artery disease in African Caribbeans from UK and Blacks from USA.

In addition to functional variants of the PON genes, it is well known that the PON expression can also be regulated by several environmental, lifestyle, nutritional and pharmaceutical factors [4]. In our study, no association between the –108T/C, the 192 Gln/Arg and the 311 Ser/Cys polymorphisms and IHD was observed in Caucasian-

Brazilian population as a whole. Excepting one study [10], these findings are in accordance with previous observations in Caucasian type 2 diabetic patients, in which no relationship was found between either the 192 Gln/Arg [10,13,18] or the 311 Ser/Cys polymorphisms [17,18]. However, we detected two significant interaction effects on the risk of IHD in Caucasians, with the –108 T/C polymorphism interacting with age and the 192 Gln/Arg polymorphism interacting with smoking status.

The –108 CC genotype has been found to be associated with longevity in healthy Sicilian octogenarians and with higher levels of PON1 activity than the –108 TT genotype [31]. Other authors have already shown an effect of interaction between the –108 T/C polymorphism and age [32], in which the –108 CC genotype was associated with a reduced risk of coronary artery disease only among individuals who were ≤ 60 years. In the present study, among young individuals (age < 54 years) the TC + TT genotypes (PON1 promoter polymorphism) were more frequent in type 2 diabetic patients without IHD than those who have this complication. As the group of young subjects was composed of a reduced number of individuals ($n = 62$), the identification of this interaction could be due to chance.

Amongst all environmental/lifestyle factors that are known to modulate the PON expression [4], cigarette smoking has been found to reduce the PON1 levels and/or activity in patients with CHD [33] and in type 2 diabetic patients [34]. In addition, cigarette smoking has often been shown to interact with either PON1 192 Gln/Arg or PON2 311 Ser/Cys polymorphisms on the risk of myocardial infarction in predominantly nondiabetic Mestizos from Costa Rica [35], and Caucasians from Spain [36] and Italy [37]. In the present study, we also observed an important effect of interaction between the 192 Gln/Arg polymorphism and smoking on the risk of IHD among Caucasian-Brazilian type 2 diabetic

patients, with the carriership of the 192 Gln-allele being more frequent among smokers with IHD than those without it.

Taken together, these results clearly show that the PON polymorphisms may still be risk factors for IHD, particularly in those groups of patients who are at high-risk, as it is the case of smokers with an already unfavourable background of diabetes. This could also explain, at least in part, the contradictory findings regarding the PON polymorphisms, particularly the 192 Gln/Arg variant and the occurrence of IHD, even in studies in patients with similar ethnic backgrounds [6,10-15].

Studies in murine models have shown that expression of PON1 is higher in females than in males [38]. Moreover, PON1 activity decreases with the menopause [39], whereas the use of hormone-replacement therapy (HRT) increases its activity in diabetic postmenopausal women [40]. The Bogalusa Heart Study [30] has observed that the PON1 192 Gln/Arg polymorphism was associated with carotid artery intima-media thickness in healthy young female Caucasian Americans. In the present study, we failed to show an interaction between PON polymorphisms and gender on the risk of IHD, among Caucasian-Brazilians. As most women were already postmenopausal, and most of them had never taken HRT, any existing interaction between PON polymorphisms and sexual hormones might have been lost.

Apart from this, it has been recognized that there are marked interethnic differences in the distribution of PON variants and in the haplotype frequencies [41,42]. Therefore, the linkage disequilibrium (LD) observed between the PON polymorphisms may be another factor partly responsible for the contrasting findings among the association studies. Also, there may be LD between PON variants with another closely linked gene on chromosome 7q.

In conclusion, the -108 T/C polymorphism of the PON1 gene was found to be associated with IHD in African-Brazilian type 2 diabetic patients, whereas the 192 Gln/Arg polymorphism was associated with an increased risk of IHD in Caucasian-Brazilian smokers with type 2 diabetes. These findings emphasize the importance of taking into account the environmental factors which can interact with genetic risk factors on the susceptibility to vascular complications and that specific groups of patients can be more prone to develop IHD.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Hugo Lisboa and his team for kindly providing part of the sample of diabetic patients analyzed in this study.

References

- [1] Sobel BE. Effects of glycemic control and other determinants on vascular disease in type 2 diabetes. *Am J Med* 2002; 113:12S-22S.
- [2] Salles GF, Bloch KV, Cardoso CR. Mortality and predictors of mortality in a cohort of Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2004; 27:1299-1305.
- [3] Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P. Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004; 5:189-218.
- [4] Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med* 2003; 81:766-779.
- [5] Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Rad Biol Med* 2005; 38:153-163.
- [6] Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, *et al.* Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998; 47:598-602.
- [7] Mackness B, Mackness MI, Arrol S, *et al.* Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1998; 139:341-349.
- [8] Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, *et al.* Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene* 1998; 213:149-157.
- [9] Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33:498-507.

- [10] James RW, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Froguel P, Blatter-Garin MC. Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000; 49:1390-1393.
- [11] Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet* 2004; 363:689-695.
- [12] Lawlor DA, Day INM, Gaunt TR, *et al.* The association of the PON1 Q192R polymorphism with coronary heart disease: findings from the British Women's Heart and Health cohort study and a meta-analysis. *BMC Genetics* 2004; 5:17.
- [13] Cao H, Girard-Globa A, Serusclat A, *et al.* Lack of association between carotid intima-media thickness and paraoxonase gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1998; 138:361-366.
- [14] Hu YM, Tian HM, Liu R. Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase 1 is associated with carotid intima-media thickness in patients of type 2 diabetes mellitus of Chinese. *Diabetes Res Clin Pract* 2003; 61:21-27.
- [15] Yamada Y, Ichihara S, Izawa H, Tanaka M, Yokota M. Genetic risk for coronary artery disease in individuals with or without type 2 diabetes. *Mol Genet Metab* 2004; 81:282-290.
- [16] Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 1998; 62:36-44.
- [17] Pinizzotto M, Castillo E, Fiaux M, Temler E, Gaillard RC, Ruiz J. Paraoxonase 2 polymorphisms are associated with nephropathy in type II diabetes. *Diabetologia* 2001; 44:104-107.

- [18] Letellier C, Durou MR, Jouanolle AM, Le Gall JY, Poirier JY, Ruelland A. Serum paraoxonase activity and paraoxonase gene polymorphism in type 2 diabetic patients with or without vascular complications. *Diabetes Metab* 2002; 28:297-304.
- [19] American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20:1183-1197.
- [20] Sixth Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Arch Intern Med* 1997; 157:2413-2445.
- [21] Rose GA, Blackburn H, Gillium RF, Prineas RJ. *Cardiovascular Survey Methods*, 2nd edn. Geneva: World Health Organization, 1982.
- [22] Beck MO, Silveiro SP, Friedman R, Clausell N, Gross JL. Asymptomatic coronary artery disease is associated with cardiac autonomic neuropathy and diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1999; 22:1745-1747.
- [23] Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:5444.
- [24] Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet* 2001; 68:1428-1436.
- [25] Motti C, Dessi M, Gnasso A, *et al.* A multiplex PCR-based DNA assay for the detection of paraoxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis* 2001; 158:35-40.
- [26] Abramson JH, Gahlinger PM. *Computer Programs for Epidemiologic Analyses: PEPI version 4.0*. 2002. (available from: <http://www.sagebrushpress.com/pepibook.html>).

- [27] Aubó C, Senti M, Marrugat J, *et al.* Risk of myocardial infarction associated with Gln/Arg 192 polymorphism in the human paraoxonase gene and diabetes mellitus. *Eur Heart J* 2000; 21:33-38.
- [28] Markus H, Kapozsta Z, Ditrich R, *et al.* Increased common carotid intima-media thickness in UK African Caribbeans and its relation to chronic inflammation and vascular candidate gene polymorphisms. *Stroke* 2001; 32:2465-2471.
- [29] Chen Q, Reis SE, Kammerer CM, *et al.* Association between the severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the National Heart, Lung, and Blood Institute-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *Am J Hum Genet* 2003; 72:13-22.
- [30] Srinivasan SR, Li S, Chen W, *et al.* Q192R polymorphism of the paraoxonase 1 gene and its association with serum lipoprotein variables and carotid artery intima-media thickness in young adults from a biracial community: The Bogalusa Heart Study. *Atherosclerosis* 2004; 177:167-174.
- [31] Campo S, Sardo MA, Trimarchi G, *et al.* Association between serum paraoxonase (PON1) gene promoter T(-107)C polymorphism, PON1 activity and HDL levels in healthy Sicilian octogenarians. *Exp Gerontol* 2004; 39:1089-1094.
- [32] Leviev I, Righetti A, James RW. Paraoxonase promoter polymorphism T(-107)C and relative paraoxonase deficiency as determinants of risk of coronary artery disease. *J Mol Med* 2001; 79:457-463.
- [33] James RW, Leviev K, Righetti A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000; 101:2252-2257.

- [34] Boemi M, Sirolla C, Testa R, Cenerelli S, Fumelli P, James RW. Smoking is associated with reduced serum levels of the antioxidant enzyme, paraoxonase, in type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2004; 21:423-427.
- [35] Sen-Banerjee S, Siles X, Campos H. Tobacco smoking modifies association between Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene and risk of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2120-2126.
- [36] Senti M, Aubó C, Tomás M. Differential effects of smoking on myocardial infarction risk according to the Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase gene. *Metabolism* 2000; 49:557-559.
- [37] Martinelli N, Girelli D, Olivieri O, *et al.* Interaction between smoking and PON2 Ser311Cys polymorphism as a determinant of the risk of myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 2004; 34:14-20.
- [38] Ali AZ, Zhang Q, Lim YK, Fang D, Retnam L, Lim SK. Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation. *Free Rad Biol Med* 2003; 34: 824-829.
- [39] Senti M, Tomás M, Vila J, *et al.* Relationship of age-related myocardial infarction risk and Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase gene: the Regicor study. *Atherosclerosis* 2001; 156:443-449.
- [40] Sutherland WH, Manning PJ, de Jong SA, Allum AR, Jones SD, Williams SM. Hormone-replacement therapy increases serum paraoxonase arylesterase activity in diabetic postmenopausal women. *Metabolism* 2001; 50:319-324.
- [41] Allebrandt KV, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro- and Afro-Brazilians. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 180:151-156.

[42] Koda Y, Tachida H, Soejima M, Takenaka O, Kimura H. Population differences in DNA sequence variation and linkage disequilibrium at the PON1 gene. *Ann Hum Genet* 2004; 68:110-119.

Table 1

Genotype and allele distribution of paraoxonase (PON) polymorphisms in Brazilian type 2 diabetic patients by ischaemic heart disease status

Polymorphism	Caucasian-Brazilians			African-Brazilians		
	Controls (n = 168)	Cases (n = 176)	<i>p</i>	Controls (n = 56)	Cases (n = 75)	<i>p</i>
PON1 -108 T/C						
TT	41 (24.4)	49 (27.8)		9 (16.1)	15 (20.0)	
TC	83 (49.4)	78 (44.4)	0.62	14 (25.0)	32 (42.7)	0.04
CC	44 (26.2)	49 (27.8)		33 (58.9)	28 (37.3)	
T-allele	165 (49)	176 (50)	0.88	32 (29)	62 (41)	0.04
C-allele	171 (51)	176 (50)		80 (71)	88 (59)	
PON1 192 Gln/Arg						
Gln/Gln	75 (44.6)	74 (42.0)		16 (28.6)	17 (22.7)	
Gln/Arg	72 (42.9)	82 (46.6)	0.78	24 (42.8)	39 (52.0)	0.57
Arg/Arg	21 (12.5)	20 (11.4)		16 (28.6)	19 (25.3)	
Gln-allele	222 (66)	230 (65)	0.90	56 (50)	73 (49)	0.93
Arg-allele	114 (34)	122 (35)		56 (50)	77 (51)	
PON2 311 Ser/Cys*						
Ser/Ser	111 (67.3)	105 (60.7)		37 (67.3)	47 (65.3)	
Ser/Cys	45 (27.3)	64 (37.0)	0.07	13 (23.6)	25 (34.7)	0.02
Cys/Cys	9 (5.4)	4 (2.3)		5 (9.1)	---	
Ser-allele	267 (81)	274 (79)	0.64	87 (79)	119 (83)	0.58
Cys-allele	63 (19)	72 (21)		23 (21)	25 (17)	

Values in parentheses refer to percentages.

* Data missing from six Caucasian- (three controls and three cases) and four African-Brazilians (one control and three cases) who could not be unambiguously genotyped.

Table 2

Multiple regression model with independent variables associated with ischaemic heart disease in African-Brazilian type 2 diabetic patients

Variables	Odds ratio	95% CI	p
TC + TT genotypes (-108 T/C polymorphism)*	4.67	1.80-12.14	0.002
Systolic blood pressure	1.02	1.01-1.04	0.027
Serum creatinine	3.02	1.01-9.00	0.047
Diabetic retinopathy	3.51	1.31-9.38	0.012

CI = confidence interval.

*Versus CC genotype.

Table 3

Effect of interaction between PON1 polymorphisms and age and smoking variables on ischaemic heart disease in Caucasian-Brazilians with type 2 diabetes

Variables	Odds ratio	95% CI	<i>p</i>
HDL-cholesterol	0.98	0.96-1.00	0.045
Diabetic retinopathy	1.68	1.04-2.74	0.035
Age > 54 years (versus < 54 years)	0.24	0.07-0.86	0.028
Smoking	0.48	0.23-1.00	0.050
TC + TT genotypes (-108 T/C polymorphism)	0.15	0.04-0.58	0.006
Gln/Arg + Arg/Arg genotypes (192 Gln/Arg polymorphism)	0.61	0.31-1.18	0.142
Age > 54 years* -108 T/C genotype	8.81	2.00-38.85	0.004
Smoking* 192 Gln/Arg genotype	3.74	1.40-9.97	0.008

CI = confidence interval. The following interactions terms were also tested in the logistic regression analysis, but had *p* values > 0.05: gender*genotype, body mass index*genotype, systolic blood pressure*genotype, HDL-cholesterol*genotype, LDL-cholesterol*genotype, triglycerides*genotype. Smoking: 0 = nonsmokers, 1 = current or former smokers.

Table 4

Effect of interaction between the 192 Gln/Arg polymorphism of PON1 and smoking on ischaemic heart disease in Caucasian-Brazilians with type 2 diabetes

Smoking	Genotype/allele	Ischaemic heart disease		<i>p</i>
		Without	With	
Smoker*	Genotype	75	79	
	Gln/Gln	39 (52.0)	25 (31.6)	0.02
	Gln/Arg + Arg/Arg	36 (48.0)	54 (68.4)	
	Allele			
	Gln	106 (71)	95 (60)	0.07
	Arg	44 (29)	63 (40)	
Nonsmoker	Genotype	92	93	
	Gln/Gln	35 (38.0)	47 (50.5)	0.12
	Gln/Arg + Arg/Arg	57 (62.0)	46 (49.5)	
	Allele			
	Gln	114 (62)	130 (70)	0.13
	Arg	70 (38)	56 (30)	

Values in parentheses refer to percentages.

* Smoker: current or former smoker.

CAPÍTULO VII

**“P22PHOX C242T POLYMORPHISM IS
ASSOCIATED WITH AN INCREASED RISK OF
OVERT NEPHROPATHY IN CAUCASIAN SMOKERS
WITH TYPE II DIABETES”**

Manuscrito submetido ao periódico

Clinical Science

p22phox C242T polymorphism is associated with an increased risk of overt nephropathy in Caucasian smokers with Type II diabetes

Kátia G. SANTOS*, Luís H. CANANI†, Jorge L. GROSS†, Balduino TSCHIEDEL‡, Kátia E. P. SOUTO‡, Israel ROISENBERG*.

*Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

†Endocrinology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

‡Endocrinology Division, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil

Key Words: diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, ischaemic heart disease, NAD(P)H oxidase, polymorphism, Type II diabetes

Short title: C242T polymorphism and nephropathy in smokers

Abbreviations: AER, albumin excretion rate; BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; CHD, coronary heart disease; CI, confidence interval; DN, diabetic nephropathy; DR, diabetic retinopathy; GPX, glutathione peroxidase; H₂O₂, hydrogen peroxide; HbA_{1c}, glycated haemoglobin, HDL, high-density lipoprotein; IHD, ischaemic heart disease; MI, myocardial infarction; NPDR, non-proliferative diabetic retinopathy; O₂⁻, superoxide anion; OR, odds ratio; PDR, proliferative diabetic retinopathy; SOD, superoxide dismutase.

Author for correspondence: Professor Dr Israel Roisenberg, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caixa Postal 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel.: +55 51 3316-6736; Fax: +55 51 3316-7311. E-mail: israberg@ufrgs.br.

ABSTRACT

In this case-control study we evaluated the association between the p22phox C242T and the catalase C(-262)T polymorphisms, and the presence of diabetic retinopathy, diabetic nephropathy and ischaemic heart disease in 700 Brazilians with Type II diabetes (518 Caucasian- and 182 African-Brazilians). Patients underwent a clinical and laboratory evaluation. Genotype analysis was performed using the polymerase chain reaction and allele-specific restriction. Logistic regression analyses were used to examine associations between the clinical and genetic variables and the presence of diabetic complications. No association between the p22phox C242T and the catalase C(-262)T polymorphisms and diabetic retinopathy, diabetic nephropathy or ischaemic heart disease was observed in either Caucasian- or African-Brazilians with Type II diabetes, in the overall population. However, when the data from Caucasian patients were stratified by gender, obesity, hypertension, glycaemic control, hypercholesterolaemia and smoking history, the T allele (p22phox C242T polymorphism) was found to be more frequent among smokers with overt nephropathy (macroalbuminuria and/or in dialysis) than those who had normo- or microalbuminuria (44% versus 31%, $P = 0.024$). The multiple logistic regression analysis confirmed that the CT + TT genotypes were independently associated with a higher risk of having overt nephropathy among Caucasian smokers with Type II diabetes [odds ratio (OR) = 7.96, 95% confidence interval (CI) 1.46-43.33]. Thus, our study shows a gene-environment interaction associated with an increased risk of progression of diabetic nephropathy in Caucasian-Brazilians with Type II diabetes.

INTRODUCTION

Diabetic retinopathy (DR), diabetic nephropathy (DN) and cardiovascular disease are frequent chronic complications of Type II diabetes. DR is the leading cause of acquired blindness [1] and DN is the main cause of end-stage renal disease [2] in Western countries. Patients with Type II diabetes have a more than threefold excess mortality rate than the general population, largely because of increased cardiovascular mortality risk [3]. The aetiology of these complications seems to be multifactorial, with an interplay between environmental and genetic risk factors [4-6].

Free radicals, such as superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), play an important physiological role in the control of cell cycle, gene expression, cell migration and remodelling of the extracellular matrix. However, they can also exert deleterious effects to cells and tissues whenever the redox balance is disrupted [7,8]. Endothelial dysfunction, mediated by increased production of $O_2^{\cdot-}$ via the NAD(P)H oxidase pathway, has been recognized as one of the major mechanisms involved in the pathogenesis of vascular diseases, such as diabetes, its complications and hypercholesterolaemia [7-9].

NAD(P)H oxidase (EC 1.6.3.1) is a membrane-associated enzyme composed of several subunits which catalyses the production of superoxide anion from oxygen and NAD(P)H, and it is the primary source of $O_2^{\cdot-}$ in the vasculature [9]. The p22phox, an essential subunit for NAD(P)H oxidase activity, is expressed at low levels in mesangial cells [7], endothelial cells, smooth muscle cells, macrophages and fibroblasts [10,11]. Its activity is upregulated in retina [12] and kidney [13] in diabetic rats, in unstable angina pectoris [14], in infarcted sites [15], and in response to stimuli, such as growth factors and cytokines [7,8].

The C242T polymorphism (His72Tyr), at exon 4 of CYBA gene (16q24) encoding the p22phox subunit of NAD(P)H oxidase, is located on a potential heme-binding site [16]. Allele variants that could disrupt the binding of p22phox to prosthetic heme group would decrease the NAD(P)H-dependent superoxide production, thus protecting against vascular diseases. In fact, the C242T polymorphism has been implicated in the susceptibility to coronary artery disease (CAD) and myocardial infarction (MI) in some studies [11,17,18], but a number of other studies have shown contradictory results [19-26]. In relation to occurrence of angiopathy in diabetic patients, the studies are scarce and controversial [27-30].

The O_2^- , produced as a by-product of cellular metabolism or by enzymes such as NAD(P)H oxidase, is converted to hydrogen peroxide (H_2O_2) by the superoxide dismutases (SODs). The H_2O_2 , which also causes oxidative damage, is then efficiently degraded to water by catalase or glutathione peroxidase (GPX) [8,31]. Catalase (EC 1.11.1.6) is an ubiquitous enzyme present in most eukaryotic organisms and together with SODs and GPX constitutes a primary defense against oxidative stress [31]. One study has reported an increased frequency of diabetes in Hungarian patients with catalase deficiency compared to healthy relatives and the general population [32]. A common polymorphism in the promoter of human catalase gene (11p13), namely C(-262)T, was described as being functionally associated with blood catalase levels. The TT homozygotes displayed higher catalase levels than CC homozygotes [33]. Then, it was suggested the T allele gives protection against oxidative damage.

Taking into account the (1) importance of NAD(P)H oxidase and catalase enzymes, the (2) contradictory findings regarding the role of p22phox C242T polymorphism in the pathogenesis of vascular diseases, and the (3) lack of studies evaluating the catalase C(-

262)T polymorphism with regard to the occurrence of angiopathy in diabetes, we were prompted to investigate the relationship between these two polymorphisms and diabetic complications.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the association between the p22phox C242T and the catalase C(-262)T polymorphisms, and the presence of diabetic retinopathy, diabetic nephropathy and ischaemic heart disease in Brazilians with Type II diabetes.

METHODS

Study population

A case-control study was carried out on 700 unrelated patients with Type II diabetes (518 Caucasian-Brazilians and 182 African-Brazilians) participating in a multicentric study in the Brazilian State of Rio Grande do Sul. Type II diabetes was diagnosed according to the American Diabetes Association criteria [34]. The patients were defined as case or control subjects according to the presence or absence of DR, DN and ischaemic heart disease. The complications were analysed separately, so the number of cases and controls varied according to the complications evaluated. Additionally, subjects in the control groups were required to have had diabetes for at least 10 years to be included in the study.

The Caucasian-Brazilian sample consisted of subjects who were descended from Europeans, mainly from Portugal, Spain, Italy, and Germany, whereas African-Brazilians were descendants of people brought to Brazil, between the 17th and 19th centuries, mainly from the west coast of Africa, Angola, and Mozambique.

Patients [391 female, 309 male; age 60.3 ± 10.0 (mean \pm S.D.); aged between 28 and 89 years; mean duration of diabetes 14.4 ± 8.1 years] underwent a standardized clinical and laboratory evaluation that consisted of a questionnaire, physical examination, and blood collection. The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki (2000) of the World Medical Association. All patients participating in this study gave their written informed consent, the protocol for which was approved by all hospital ethics committees.

Assessment of diabetic complications

Assessment of DR was performed by ophthalmoscopic examination through dilated pupils, and fluorescein angiography was obtained when indicated. Diabetic retinopathy was graded as: absent, non-proliferative (microaneurysms, hard exudates, retinal haemorrhages, intraretinal microvascular abnormalities), or proliferative (new vessels within one disc diameter of the disc and/or new vessels originating elsewhere).

Regarding the presence of DN, the diagnosis was based on the albumin excretion rate (AER) in at least two of three consecutive 24-h timed or random spot sterile urine collections. Patients were classified as having normoalbuminuria (AER < 20 µg/min or < 17 mg/l), incipient DN (microalbuminuria) (AER 20-199 µg/min or 17-174 mg/l), or overt DN. Overt DN was defined by the presence of macroalbuminuria (AER ≥ 200 µg/min or > 174 mg/l) or by the presence of chronic renal failure treated by dialysis when other causes of proteinuria or renal disease were ruled out.

The diagnosis of ischaemic heart disease (IHD) was based on the presence of angina pectoris or possible acute MI according to the World Health Organization questionnaire for cardiovascular disease [35], and/or on the presence of resting electrocardiogram abnormalities (Minnesota Code) [36] and/or on the presence of perfusion abnormalities (fixed or variable) upon myocardial scintigraphy at rest and after dipyridamole administration.

Definitions

Weight and height were used to calculate body mass index (BMI) (kg/m²). Patients were considered to be obese if they had BMI > 30 kg/m². Blood pressure was measured after a 5-min rest in the sitting position using a standard mercury sphygmomanometer. Hypertension was defined as blood pressure levels ≥ 140/90 mmHg, or if the patient was

on treatment with antihypertensive medication [37]. Hypercholesterolaemia was defined as total cholesterol levels ≥ 5.7 mmol/l, or if the patient was using lipid-lowering drugs. Patients who were former or current smokers were considered as having a positive history of smoking.

Biochemical measurements

Glycated haemoglobin (HbA_{1c}) was measured using standardized assays (reference range: 4.7-6.0%). Serum creatinine concentrations were determined by Jaffé's reaction and urinary albumin concentration by immunoturbidimetry (Sera-Pak immuno microalbuminuria; Bayer, Tarrytown, USA). Total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were measured by standard enzymatic methods.

Genotyping

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by a salting-out procedure [38]. Both p22phox C242T and catalase C(-262)T polymorphisms were PCR amplified using primers and conditions as previously described [17,33]. The amplified products were digested with the appropriate restriction enzymes under the conditions recommended by the manufacturer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot., Germany). For the p22phox C242T polymorphism, the digested fragments were separated by electrophoresis on 1.8% agarose gels, and for the catalase C(-262)T polymorphism, the digested products were separated on 6% polyacrilamide gels, both followed by ethidium bromide staining, and direct visualization under ultraviolet light.

Statistical analysis

Allele frequencies were determined by gene counting, and departures from the Hardy-Weinberg equilibrium were verified using the χ^2 test. Allele and genotype distributions among groups of subjects were evaluated using the χ^2 test or Fisher's exact test, whichever appropriate, using PEPI program [39]. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

Multiple logistic regression analysis was used to control for independent risk factors associated with DR, DN or IHD whenever a statistically significant association was found in the univariate analyses, using the SPSS package (SPSS for Windows, version 10.0).

RESULTS

Polymorphism distribution in Type II diabetic patients

The genotype and the allele frequencies of the p22phox C242T and the catalase C(-262)T polymorphisms are given in Table 1. The genotype frequencies were in agreement with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium for both polymorphisms, in Caucasian-Brazilians as well as in African-Brazilians. The allele and genotype frequencies for the catalase C(-262)T polymorphism in Caucasian-Brazilians were significantly different from those of African-Brazilians ($P < 0.01$).

Relationship between p22phox and catalase polymorphisms and diabetic complications

The genotype and the allele frequencies of p22phox and catalase polymorphisms in patients with Type II diabetes according to the presence or absence of diabetic complications are shown in Tables 2 and 3, for Caucasian- and African-Brazilians, respectively. The genotype and the allele frequencies in patients with DR, DN or IHD were not significantly different from those of diabetic individuals without these complications ($P > 0.05$ for all comparisons).

Relationship between p22phox and catalase polymorphisms and diabetic complications in Caucasian-Brazilians stratified by demographic and clinical factors

Since diabetic complications have a multifactorial aetiology, and the interaction between genetic variants and demographic and clinical factors might influence the individual risk of developing these complications, we also analysed the relationship between p22phox

C242T and catalase C(-262)T polymorphisms and DR, DN and IHD in patients stratified by gender, obesity, hypertension, glycaemic control (HbA_{1c} > 6% versus < 6%), hypercholesterolaemia and smoking history. As the number of African-Brazilians was too small to have sufficient statistical power, we only conducted the stratified analysis in Caucasian-Brazilian patients.

Table 4 shows that among Caucasian-Brazilian smokers, there was a significant association between the p22phox C242T polymorphism and the occurrence of overt nephropathy, under a dominant model, with those subjects with overt nephropathy having a higher frequency of the T allele. The multiple logistic regression analysis, adjusted for systolic blood pressure, serum creatinine, triglycerides, use of insulin for diabetes treatment and presence of DR and IHD, confirmed that the CT + TT genotypes were independently associated with a higher risk of having overt nephropathy [odds ratio (OR) = 7.96, 95% confidence interval (CI) 1.46-43.33]. The CT + TT genotypes were also more frequent among smokers with nephropathy of any degree than those who were normoalbuminurics (64% versus 48%, *P* = 0.043). However, in the multiple analysis, they were no longer associated with the presence of DN (OR = 1.09, 95% CI 0.56-2.10) after adjustment for gender, systolic blood pressure, serum creatinine, triglycerides and presence of DR.

When patients were stratified by hypercholesterolaemia (282 with and 187 without), the prevalence of T allele (C242T polymorphism) was higher among hypercholesterolaemic patients with DN (40%) than those without this complication (30%), and the carriership of T allele was found to be associated with DN. However, the CT + TT genotypes did not remain associated with DN in the multiple logistic regression

analysis (OR = 1.49, 95% CI 0.69-3.22), controlling for gender, serum creatinine and the presence of DR and IHD.

The genotype and allele frequencies in Caucasian-Brazilians with DR, DN or IHD were not different from those without these complications when they were stratified for gender, obesity, hypertension and glycaemic control. Likewise, the catalase C(-262)T polymorphism was not shown to be related to any of the diabetic complications analysed in this study, even after stratifying the data for gender, obesity, hypertension, glycaemic control, hypercholesterolaemia and smoking history (data not shown).

DISCUSSION

In the present study, no association between the p22phox C242T and the catalase C(-262)T polymorphisms and DR, DN or IHD was observed in either Caucasian- or African-Brazilians with Type II diabetes. Our findings are in accordance with previous observations, in which no relationship was found between the p22phox C242T polymorphism and coronary heart disease (CHD) [19-22] and MI [19,21-23] in Caucasians and MI in Japanese [24], Asian Indians and Chinese [25]. Moreover, a recent study reporting on IHD in Irish subjects has found no association between this disorder and the C242T polymorphism [26]. In that study, the authors used two family-based association methods, which are considered to avoid the biases intrinsic to case-control studies [40].

However, a number of other case-control studies have produced conflicting results, with some studies reporting a lower risk associated with the carriership of the T allele in CAD [11,17]. Alternatively, homozygous patients for C allele were also found to have a significantly blunted endothelium-dependent dilator response [41], though two other studies with predominantly Caucasian individuals have not detected a relationship of C242T polymorphism to endothelial function [20,42]. In contrast, the T allele was associated with progression of coronary atherosclerosis in a prospective study of American patients [18].

Although Guzik and co-workers [43] found that the T allele was associated with a lower superoxide production in human blood vessels taken from patients undergoing routine coronary artery bypass surgery, the method employed to measure O_2^- production using lucigenin-enhanced chemiluminescence has been criticized [44]. Superoxide anion is an extremely short-lived and highly reactive molecule [8], and the assay method used can generate free radicals itself, so it may be imprecise. In addition, extrapolation of *ex vivo*

results, mainly data from saphenous veins, to the *in vivo* process of coronary atherosclerosis may be unwarranted [44].

Although two independent groups of researchers [10,11], in studies of human coronary artery sections taken at autopsy, found that as atherosclerosis progressed the expression of p22phox increased throughout the vessel wall, it is still controversial whether the C242T polymorphism could have a direct impact on $O_2^{\cdot-}$ production by NAD(P)H oxidase [26,44].

It is worthwhile to note that, as already discussed by some authors [6,19,45], though CAD and MI are related conditions, their aetiologies are somewhat different. Thus, genes that confer susceptibility to CAD may differ from those that affect MI. This can partially explain why there are conflicting findings regarding the role of C242T polymorphism in the pathogenesis of vascular diseases.

Nevertheless, all these studies were carried out having CHD as the clinical outcome, regardless of the presence or absence of diabetes mellitus. Studies designed to investigate the role of p22phox C242T polymorphism in the development of diabetic complications are scarce. A recent study in Japanese Type II diabetic patients [27] has observed that the CC genotype was associated with an increased risk of progression of asymptomatic atherosclerosis in diabetic individuals. Interestingly, this association was not found in nondiabetic subjects. The CC genotype was also associated with higher fasting plasma insulin concentration and insulin resistance in nondiabetic Japanese. However, an association between C242T polymorphism and DR and DN was not found in that study, as was reported in another study of Japanese patients with Type II diabetes [28]. In contrast, a very recent study has found that the CC genotype was associated with DN in Japanese

Type II diabetic patients [29], while the TT genotype was found to be associated with this complication in Caucasians with Type I diabetes [30].

Another fact that should be pointed out is the heterogeneity observed between specific groups of patients with regard to vascular diseases. In the present study, despite having found no association between the p22phox C242T polymorphism and DR, DN or IHD in either Caucasian- or African-Brazilians with Type II diabetes in the overall population, when Caucasian patients were stratified by demographic and clinical factors, the CT + TT genotypes were independently associated with a higher risk of having overt DN, only among patients with a positive history of smoking. Our results are supported by epidemiological studies which demonstrated that hypercholesterolaemia [43] and diabetes [9,43] are independent factors associated with increased vascular superoxide production. Notably, stable compounds of cigarette smoke, e.g. acrolein, were also found to increase the superoxide production via NAD(P)H oxidase activation *in vitro* and *ex vivo* mammalian models [46].

In a large Japanese study [45], the T allele was shown to be protective against CAD in men with nonfamilial hypercholesterolaemia, but not in men without this condition. We did not find such associations. In our study, the T allele was found to be more frequent among hypercholesterolaemic patients with DN than those without this complication. However, the carriership of the T allele was not associated with DN, after controlling for the other risk factors associated with this complication. Three reasons could explain these discrepant results. First, the Japanese study included patients with or without diabetes mellitus, and the frequency of diabetes was higher among patients with CAD than those without it. Maybe, the presence of diabetes surpassed the effect produced by the interaction between hypercholesterolaemia and the C242T polymorphism. So, both groups of diabetic

patients (with or without hypercholesterolaemia) are at risk of developing IHD. Second, the sample size in the Japanese study was larger than ours. Third, and not least important, the present study was designed to investigate diabetic microangiopathy and IHD in patients with Type II diabetes, whereas CAD was the phenotype analysed in the Japanese study. Again, genes that confer susceptibility to CAD may be different from those that affect IHD. In a study of Australians [23], the T allele was associated with increased risk of CAD in younger males, but not in the overall population. However, the sample size was too small to define with certainty the involvement of C242T polymorphism in this specific group of patients.

The ethnic background has often been evoked to explain the conflicting findings [18,20,26,27]. This seems to be unlikely, because even studies in patients with the same ethnic background have shown opposite results [11,17,18,20,25,41,42].

Apart from this, we should take into account that the C242T polymorphism could be in linkage disequilibrium with an adjacent region within the CYBA gene that confers susceptibility, or protection, to diabetic complications. Gardemann and co-workers [19], in a large study of German patients, observed that the A640G polymorphism, located in the 3' untranslated region of CYBA gene, was associated with the presence and the extent of CAD in younger males, as the AA genotype was preferentially found in patients with CAD. However, the C242T polymorphism was related neither to CAD nor to MI.

With regard to the catalase C(-262)T polymorphism, to our knowledge, this is the first study which investigated the relationship between the C(-262)T polymorphism and diabetic complications in patients with Type II diabetes. No association between this polymorphism and DR, DN or IHD was observed in either Caucasian- or African-Brazilians with Type II diabetes, even after stratification for demographic and clinical

factors. The T allele frequency observed in our study was lower than that previously found in Swedish [23], American [47] and Danish [48] individuals. The American study has shown no protective effect conferred by the C(-262)T polymorphism to Alzheimer's disease in Caucasians [47]. Likewise, a very recent study in Danish adults has found no major effects of this polymorphism on survival, physical and cognitive functioning, as well as on several oxidative stress-mediated disorders, including IHD and diabetes [48].

A number of studies have evaluated the levels of catalase in Type II diabetes and its complications, but with inconsistent results. While some authors have reported that catalase activity is upregulated in atherosclerotic lesions [49] and in patients with Type II diabetes, as compared to nondiabetic individuals [50,51], other studies have found that catalase activity is downregulated in patients with Type II diabetes [52], and even more in the presence of DN [53]. Apart from this, there are authors reporting no difference at all with regard to catalase activity between diabetic and nondiabetic individuals [54]. Equal to our study, the American [47] and the Danish [48] studies analysed the C(-262)T polymorphism but did not measure the activity of catalase. Therefore, it is not possible to verify whether the C(-262)T polymorphism could explain these discrepancies.

In conclusion, the T allele (p22phox C242T polymorphism) was independently associated with an increased risk of overt DN among Caucasian smokers with Type II diabetes. This study clearly shows a gene-environment interaction involved in the progression of diabetic nephropathy. Therefore, further studies are necessary to help to identify the specific subgroups of patients who are at risk of developing diabetic complications, thereby requiring a more intensive treatment in order to prevent the onset and/or the progression of diabetic complications.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Dr. Hugo Lisboa and his team for kindly providing part of the sample of diabetic patients analysed in this study. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

REFERENCES

1. Fong, D. S., Aiello, L., Gardner, T. W. et al. (2004) Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care* **27**, S84-S87
2. Bruno, R. M. and Gross, J. L. (2000) Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6-year follow-up study. *J. Diabetes Complications* **14**, 266-271
3. Salles, G. F., Bloch, K. V. and Cardoso, C. R. (2004) Mortality and predictors of mortality in a cohort of Brazilian Type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **27**, 1299-1305
4. Chowdhury, T. A., Dyer, P. H., Kumar, S., Barnett, A. H. and Bain, S. C. (1999) Genetic determinants of diabetic nephropathy. *Clin. Sci.* **96**, 221-230
5. Warpeha, K. M. and Chakravarthy, U. (2003) Molecular genetics of microvascular disease in diabetic retinopathy. *Eye* **17**, 305-311
6. Lusis, A. J., Mar, R. and Pajukanta, P. (2004) Genetics of atherosclerosis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **5**, 189-218
7. Li, J. M. and Shah, A. M. (2003) ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, S221-S226
8. Li, J. M. and Shah, A. M. (2004) Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287**, R1014-R1030
9. Hink, U., Li, H., Mollnau, H. et al. (2001) Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ. Res.* **88**, e14-e22
10. Azumi, H., Inoue, N., Takeshita, S. et al. (1999) Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation* **100**, 1494-1498

11. Yokoyama, M., Inoue, N. and Kawashima, S. (2000) Role of the vascular NADH/NADPH oxidase system in atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **902**, 241-247
12. Ellis, E. A., Grant, M. B., Murray, F. T. et al. (1998) Increased NADH oxidase activity in the retina of the BBZ/WOR diabetic rat. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 111-120
13. Etoh, T., Inoguchi, T., Kakimoto, M. et al. (2003) Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment. *Diabetologia* **46**, 1428-1437
14. Azumi, H., Inoue, N., Ohashi, Y. et al. (2002) Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **22**, 1838-1844
15. Fukui, T., Yoshiyama, M., Hanatani, A., Omura, T., Yoshikawa, J. and Abe, Y. (2001) Expression of p22-phox and gp91-phox, essential components of NADPH oxidase, increases after myocardial infarction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 1200-1206
16. Dinanuer, M. C., Pierce, E. A., Bruns, G. A. P., Curnutte, J. T. and Orkin, S. H. (1990) Human neutrophil cytochrome b light chain (p22phox): gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* **86**, 1729-1737
17. Inoue, N., Kawashima, S., Kanazawa, K., Yamada, S., Akita, H. and Yokoyama, M. (1998) Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22phox gene in patients with coronary artery disease. *Circulation* **97**, 135-137

18. Cahilly, C., Ballantyne, C. M., Lim, D. S., Gotto, A. and Marian, A. J. (2000) A variant of p22phox, involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Circ. Res.* **86**, 391-395
19. Gardemann, A., Mages, P., Katz, N., Tillmanns, H. and Haberbosch, W. (1999) The p22phox A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. *Atherosclerosis* **145**, 315-323
20. Li, A., Prasad, A., Mincemoyer, R. et al. (1999) Relationship of the C242T p22phox gene polymorphism to angiographic coronary artery disease and endothelial function. *Am. J. Med. Genet.* **86**, 57-61
21. Stanger, O., Renner, W., Khoschsorur, G., Rigler, B. and Wascher, T. C. (2001) NADH/NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and lipid peroxidation in coronary artery disease. *Clin. Physiol.* **21**, 718-722
22. Mata-Balaguer, T., de la Herrán, R., Ruiz-Rejón, C., Ruiz-Rejón, M., Garrido-Ramos, M. A. and Ruiz-Rejón, F. (2004) Angiotensin-converting enzyme and p22phox polymorphisms and the risk of coronary heart disease in a low-risk Spanish population. *Int. J. Cardiol.* **95**, 145-151
23. Cai, H., Duarte, N., Wilcken, D. E. L. and Wang, X. L. (1999) NADH/NADPH oxidase p22phox C242T polymorphism and coronary artery disease in the Australian population. *Eur. J. Clin. Invest.* **29**, 744-748
24. Yamada, Y., Izawa, H., Ichihara, S. et al. (2002) Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1916-1923
25. Saha, N., Sanghera, D. K. and Kamboh, M. I. (1999) The p22phox polymorphism C242T is not associated with CHD risk in Asian Indians and Chinese. *Eur. J. Clin. Invest.* **29**, 999-1002

26. Spence, M. S., McGlinchey, P. G., Patterson, C. C. et al. (2003) Investigation of the C242T polymorphism of NAD(P)H oxidase p22 phox gene and ischaemic heart disease using family-based association methods. *Clin. Sci.* **105**, 677-682
27. Hayaishi-Okano, R., Yamasaki, Y., Kajimoto, Y. et al. (2003) Association of NAD(P)H oxidase p22phox gene variation with advanced carotid atherosclerosis in Japanese type 2 diabetes. *Diabetes Care* **26**, 458-463
28. Nakano, T., Matsunaga S., Nagata, A. and Maruyama, T. (2003) NAD(P)H oxidase p22phox gene C242T polymorphism and lipoprotein oxidation. *Clin. Chim. Acta* **335**, 101-107
29. Matsunaga-Irie, S., Maruyama, T., Yamamoto Y. et al. (2004) Relation between development of nephropathy and the p22phox C242T and receptor for advanced glycation end product G1704T gene polymorphisms in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **27**, 303-307
30. Hodgkinson, A. D., Millward, B. A. and Demaine, A. G. (2003) Association of the p22phox component of NAD(P)H oxidase with susceptibility to diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* **26**, 3111-3115
31. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford.
32. Góth, L. and Eaton, J. W. (2000) Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet* **356**, 1820-1821
33. Forsberg, L., Lyrenäs, L., de Faire, U. and Morgenstern, R. (2001) A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 500-505

34. American Diabetes Association. (1997) Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **20**, 1183-1197
35. Rose, G. A., Blackburn, H., Gillium, R. F. and Prineas, R. J. (1982) *Cardiovascular Survey Methods*. World Health Organization, Geneva.
36. Coronary Drug Project Research Group. (1973) The coronary drug project: design, methods, and baseline results. *Circulation* **47**, I1-I50
37. Sixth Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. (1997) *Arch. Intern. Med.* **157**, 2413-2445
38. Lahiri, D. K. and Nurnberger, J. I. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5444
39. Abramson, J. H. and Gahlinger, P. M. (2002) Computer Programs for Epidemiologic Analyses: PEPI version 4.0 (available in <http://www.sagebrushpress.com/pepibook.html>).
40. Lander, E. S. and Schork, N. J. (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* **265**, 2037-2048
41. Schächinger, V., Britten, M. B., Dimmeler, S. and Zeiher, A. M. (2001) NADH/NADPH oxidase p22 phox gene polymorphism is associated with improved coronary endothelial vasodilator function. *Eur. Heart J.* **22**, 96-101
42. Schneider, M. P., Hilgers, K. F., Huang, Y. et al. (2003) The C242T p22phox polymorphism and endothelium-dependent vasodilation in subjects with hypercholesterolaemia. *Clin. Sci.* **105**, 97-103
43. Guzik, T. J., West, N. E. J., Black, E. et al. (2000) Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation* **102**, 1744-1747

44. Whitehead, A. S. and FitzGerald, G. A. (2001) Twenty-first century phox: not yet ready for widespread screening. *Circulation* **103**, 7-9
45. Shimokata, K., Yamada, Y., Kondo, T. et al. (2004) Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in individuals with or without nonfamilial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **172**, 167-173
46. Jaimes, E. A., DeMaster, E. G., Tian, R. X. and Raij, L. (2004) Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADPH oxidase activation. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **24**, 1031-1036
47. Goulas, A., Fidani, L., Kotsis, A. et al. (2002) An association study of a functional catalase gene polymorphism, -262C→T, and patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **330**, 210-212
48. Christiansen, L., Petersen, H. C., Bathum, L., Frederiksen, H., McGue, M. and Christensen, K. (2004) The catalase -262C/T promoter polymorphism and aging phenotypes. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **59**, B886-B889
49. Kobayashi, S., Inoue, N., Azumi, H. et al. (2002) Expressional changes of the vascular antioxidant system in atherosclerotic coronary arteries. *J. Atheroscler. Thromb.* **9**, 184-190
50. Kesavulu, M. M., Rao, B. K., Giri, R., Vijaya, J., Subramanyam G. and Apparao, Ch. (2001) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **53**, 33-39
51. Atli, T., Keven, K., Avci, A. et al. (2004) Oxidative stress and antioxidant status in elderly diabetes mellitus and glucose intolerance patients. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **39**, 269-275

52. Turk, H. M., Sevinc, A., Camci, C. et al. (2002) Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* **39**, 117-122
53. Kedziora-Kornatowska, K. Z., Luciak, M., Blaszczyk, J. and Pawlak, W. (1998) Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **13**, 2829-2832
54. Muchová, J., Liptáková, A., Országhová, Z. et al. (1999) Antioxidant systems in polymorphonuclear leucocytes of type 2 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* **16**, 74-78

Table 1 Genotype and allele distributions of p22phox and catalase polymorphisms in Type II diabetic patients

*Data missing from five Caucasian- and one African-Brazilian who could not be unambiguously genotyped for the C242T polymorphism.

		Caucasian-Brazilians	African-Brazilians	<i>P</i>
Polymorphism	Genotype/allele	(<i>n</i> =518)	(<i>n</i> =182)	
p22phox C242T*				
Genotype frequency	CC	223 (0.43)	66 (0.37)	0.160
	CT	230 (0.45)	96 (0.53)	
	TT	60 (0.12)	19 (0.10)	
Allele frequency	C	0.66	0.63	0.351
	T	0.34	0.37	
catalase C(-262)T				
Genotype frequency	CC	333 (0.64)	139 (0.76)	0.003
	CT	163 (0.32)	42 (0.23)	
	TT	22 (0.04)	1 (0.01)	
Allele frequency	C	0.80	0.88	0.001
	T	0.20	0.12	

Table 2 Genotype and allele frequencies of p22phox and catalase polymorphisms in Caucasian-Brazilians with Type II diabetes according to diabetic complications status

$P > 0.05$ for all comparisons

Polymorphism	Genotype/ allele	<u>Retinopathy</u>		<u>Nephropathy</u>		<u>Ischaemic heart disease</u>	
		Without	With	Without	With	Without	With
p22phox C242T	<i>n</i>	162	307	190	257	166	174
Genotype frequency	CC	67 (0.41)	138 (0.45)	89 (0.47)	100 (0.39)	74 (0.44)	72 (0.41)
	CT	77 (0.48)	133 (0.43)	79 (0.42)	121 (0.47)	69 (0.42)	80 (0.46)
	TT	18 (0.11)	36 (0.12)	22 (0.11)	36 (0.14)	23 (0.14)	22 (0.13)
Allele frequency	C	0.65	0.67	0.68	0.62	0.65	0.64
	T	0.35	0.33	0.32	0.38	0.35	0.36
catalase C(-262)T	<i>n</i>	164	310	193	258	168	176
Genotype frequency	CC	103 (0.63)	205 (0.66)	123 (0.64)	169 (0.66)	115 (0.69)	108 (0.61)
	CT	56 (0.34)	90 (0.29)	64 (0.33)	76 (0.29)	46 (0.27)	61 (0.35)
	TT	5 (0.03)	15 (0.05)	6 (0.03)	13 (0.05)	7 (0.04)	7 (0.04)
Allele frequency	C	0.80	0.81	0.80	0.80	0.82	0.79
	T	0.20	0.19	0.20	0.20	0.18	0.21

Table 3 Genotype and allele frequencies of p22phox and catalase polymorphisms in African-Brazilians with Type II diabetes according to diabetic complications status

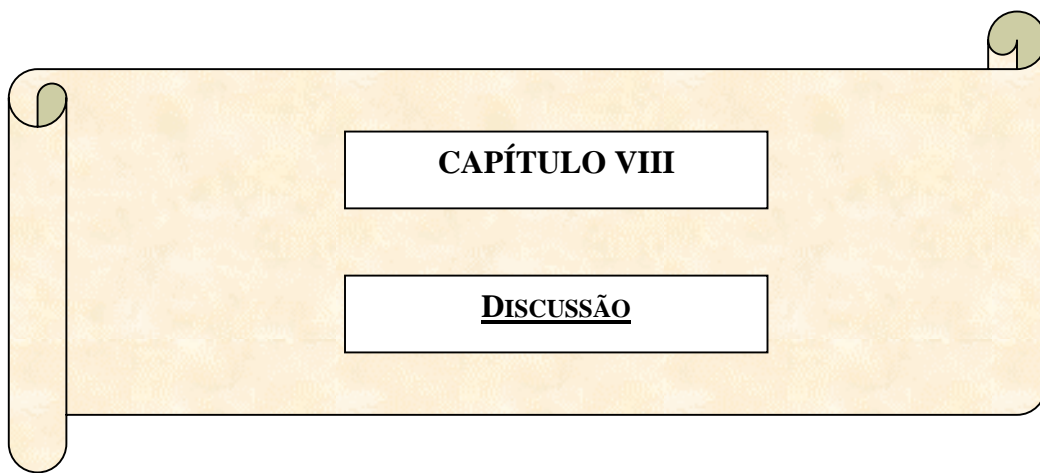
$P > 0.05$ for all comparisons

Polymorphism	Genotype/ allele	<u>Retinopathy</u>		<u>Nephropathy</u>		<u>Ischaemic heart disease</u>	
		Without	With	Without	With	Without	With
p22phox C242T	<i>n</i>	63	107	65	94	55	74
Genotype frequency	CC	20 (0.32)	41 (0.38)	24 (0.37)	35 (0.37)	17 (0.31)	29 (0.39)
	CT	37 (0.59)	53 (0.50)	34 (0.52)	49 (0.52)	33 (0.60)	35 (0.47)
	TT	6 (0.09)	13 (0.12)	7 (0.11)	10 (0.11)	5 (0.09)	10 (0.14)
Allele frequency	C	0.61	0.63	0.63	0.63	0.61	0.63
	T	0.39	0.37	0.37	0.37	0.39	0.37
catalase C(-262)T	<i>n</i>	63	108	74	95	55	75
Genotype frequency	CC	46 (0.73)	83 (0.77)	53 (0.72)	74 (0.78)	45 (0.82)	52 (0.69)
	CT	17 (0.27)	24 (0.22)	21 (0.28)	20 (0.21)	10 (0.18)	23 (0.31)
	TT	---	1 (0.01)	---	1 (0.01)	---	---
Allele frequency	C	0.87	0.88	0.86	0.88	0.82	0.79
	T	0.13	0.12	0.14	0.12	0.18	0.21

Table 4 Genotype and allele frequencies of p22phox C242T polymorphism in Caucasian-Brazilian Type II diabetic patients according to overt nephropathy and smoking status

The group of patients with a positive history of smoking includes current + former smokers. *Without overt nephropathy comprises normo- + microalbuminuria. †Unadjusted odds ratio (95% CI) for CT + TT vs. CC genotype.

Smoking	Genotype/ allele	<u>Overt nephropathy</u>		Odds ratio† (95% CI)	<i>P</i>
		Without	With		
Positive	Genotype frequency	133	62		
	CC	64 (0.48)	19 (0.31)	2.10	
	CT + TT	69 (0.52)	43 (0.69)	(1.11-3.97)	
	Allele frequency				
	C	0.69	0.56		0.024
	T	0.31	0.44		
Negative	Genotype frequency	172	74		
	CC	71 (0.41)	29 (0.39)	1.09	
	CT + TT	101 (0.59)	45 (0.61)	(0.62-1.90)	
	Allele frequency				
	C	0.65	0.61		0.455
	T	0.35	0.39		



8. DISCUSSÃO

O presente trabalho procurou identificar variantes genéticas associadas às complicações crônicas no DM2. Como discutido nos capítulos anteriores, dos 11 polimorfismos analisados no presente estudo, 6 estiveram associados à presença de uma ou mais complicações crônicas no DM2. Considerando o elevado número de comparações realizadas, é possível que algumas das associações encontradas possam ser, eventualmente, atribuídas ao acaso. No entanto, a extrema relevância fisiológica das proteínas codificadas pelos genes do RAGE, da AR, das PONs e da NAD(P)H oxidase torna essas associações biologicamente plausíveis. Nos últimos cinco anos, novas funções foram descritas para estas proteínas, evidenciando sua importância fundamental para as vias de transdução de sinal (RAGE e NADP(P)H oxidase) ou para o metabolismo energético (AR e PON). Como a expressão destes genes é estritamente regulada por diversos fatores físico-químicos, variantes que interfiram na sua expressão, mesmo que de forma moderada, podem comprometer a função normal da célula e contribuir para a disfunção endotelial que ocorre nas complicações vasculares do DM. Excetuando o polimorfismo no gene da NAD(P)H oxidase, para todos os demais polimorfismos analisados no presente estudo que demonstraram associação com uma das complicações crônicas existem fortes evidências experimentais de que eles afetam a expressão gênica e/ou a atividade da proteína.

8.1. A hipótese da “doença comum/variante comum” e o modelo das variantes raras

Ainda não existe um consenso em relação ao tipo de variante genética envolvida na patogênese da maior parte das doenças complexas (Zhao *et al.*, 2003).

A hipótese da “doença comum/variante comum” postula que as doenças genéticas complexas são afetadas por alelos de susceptibilidade em alguns locos, que se encontram em alta frequência em populações etnicamente diversas. Esses alelos comuns são antigos e antecedem à divergência das populações humanas (Zondervan e Cardon, 2004). Se esta hipótese estiver correta, os genes de predisposição para as doenças complexas que são mapeados em populações africanas através da associação entre os SNPs e o fenótipo clínico podem ter importantes implicações para a elucidação dos fatores genéticos de risco para muitos grupos étnicos (Tishkoff e Williams, 2002; Kittles e Weiss, 2003).

Por outro lado, o modelo de variantes raras postula que algumas doenças complexas são influenciadas por alelos raros de susceptibilidade distribuídos em vários locos, como indicado por estudos de simulação (Zondervan e Cardon, 2004). Considerando que esses alelos são geograficamente restritos devido à mutação, deriva genética ou seleção, então a caracterização da diversidade de SNPs, da estrutura haplotípica e do desequilíbrio de ligação em populações de origem africana são particularmente importantes para os estudos das doenças complexas que são prevalentes em populações de descendência africana recente (Tishkoff e Williams, 2002; Kittles e Weiss, 2003).

8.2. Os métodos de identificação dos alelos de susceptibilidade para as doenças complexas

Entre as várias abordagens utilizadas para a elucidação das bases genéticas das doenças complexas, os estudos de associação têm sido considerados como uma etapa crucial para a identificação das variantes genéticas que conferem susceptibilidade às doenças, por serem mais robustos e com maior poder de análise do que o obtido nos estudos de ligação, apesar de suas limitações (Morton e Collins, 1998; Cardon e Bell, 2001; Rogus *et al.*, 2002).

Independente da estratégia de associação utilizada, a evidência definitiva sobre o impacto de uma determinada variante genética é provida por meio dos estudos funcionais e de ligação, bem como pela replicação dos resultados por outros estudos independentes (Cardon e Bell, 2001). Atualmente, os estudos experimentais com animais transgênicos e nocauteados se constituem em importantes ferramentas na busca pela identificação do componente genético do DM e suas complicações crônicas (Susztak *et al.*, 2003).

Por meio dos estudos de ligação várias mutações causadoras de doenças monogênicas foram identificadas. No entanto, o efeito pequeno conferido pelas variantes genéticas e a ausência de uma clara segregação de variantes genéticas em várias gerações familiares não permite uma boa resolução deste tipo de abordagem para as doenças complexas (Cardon e Bell, 2001).

8.3. Os estudos de associação do tipo caso-controle

Os estudos de associação representam um passo essencial na elucidação e caracterização das bases genéticas das doenças multifatoriais, especialmente pela disponibilidade de mapas densos de SNPs através do genoma, pelo desenvolvimento de tecnologia para a genotipagem em grande escala e pela disponibilidade de análises estatísticas que possibilitam a comparação simultânea de vários locos (Cardon e Bell, 2001).

Contudo, os estudos de caso-controle são propensos a três tipos de vieses: seleção (distorcem os resultados pelo recrutamento diferencial dos participantes), aferição (o processo de mensuração dos dados é sistematicamente diferente nos dois grupos em comparação) e confusão (quando não há comparabilidade dos grupos estudados quanto às variáveis de confusão) (Schmidt e Duncan, 1999). Esses vieses têm gerado resultados que não são confirmados em diferentes estudos (Schmidt e Duncan, 1999; Cardon e Bell, 2001).

A variabilidade observada entre os diversos estudos de caso-controle, em relação ao papel da disfunção endotelial e do estresse oxidativo nas complicações do DM, ocorre devido à heterogeneidade referente aos critérios de seleção dos pacientes e dos genes candidatos, ao tamanho amostral, à estratificação populacional, ao tempo de duração do DM, à coexistência das complicações crônicas, ao exame ou critério diagnóstico das complicações, ao viés de publicação e aos modelos experimentais utilizados. Além disso, a constante busca pelo aprimoramento no delineamento e nos métodos de estudo têm contribuído para um elevado grau de variabilidade nas abordagens que estão em andamento.

8.3.1. A seleção dos casos e controles

O delineamento de qualquer estudo de caso-controle envolve dois pontos cruciais: a seleção dos indivíduos (principalmente os controles) e a seleção das variantes genéticas (Cardon e Bell, 2001).

Para evitar os vieses de seleção, os indivíduos devem ser selecionados a partir de uma mesma população de origem, a fim de obter a homogeneidade dos casos e controles em relação à ancestralidade genética e aos fatores de risco ambientais (Zondervan e Cardon, 2004). É pouco provável que tenham ocorrido vieses de seleção no presente estudo. Tanto os casos quanto os controles foram selecionados nos ambulatórios do Serviço de Endocrinologia de três hospitais de referência do Estado do RS, a saber: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Grupo Hospitalar Conceição (ambos em Porto Alegre) e Hospital São Vicente de Paula (Passo Fundo).

Da mesma forma, é improvável que tenham ocorrido vieses de aferição. Todos os pacientes passavam por um exame clínico e por uma entrevista por meio de protocolo padronizado (anexo I) antes do encaminhamento para a realização dos exames diagnósticos das complicações crônicas. Além disso, a análise dos polimorfismos era realizada sem a identificação prévia dos pacientes quanto às complicações crônicas do DM. Uma breve caracterização clínica e laboratorial dos 703 pacientes com DM2 analisados no presente estudo pode ser visualizada na tabela 1 (anexo II).

8.3.2. A seleção dos genes candidatos

A seleção dos genes candidatos e dos polimorfismos a serem analisados deve ser cuidadosa, principalmente para as variantes recentemente descritas, como ilustrado pelos exemplos descritos a seguir.

No ano 2000, um estudo publicado em um periódico científico de grande impacto demonstrou que o polimorfismo 894G>T (E298D) estava associado aos níveis de eNOS, pois a proteína com o resíduo Asp na posição 298 era susceptível à clivagem por proteases endógenas (Tesauro *et al.*, 2000). Desde então, diversos autores sentiram-se impelidos a analisar a relação deste polimorfismo com as doenças cardiovasculares. Posteriormente, vários estudos independentes demonstraram que o polimorfismo 894G>T não exerce nenhum efeito sobre a atividade da eNOS, tanto *in vitro* (Fairchild *et al.*, 2001; Golser *et al.*, 2003) como *in vivo* (McDonald *et al.*, 2004), e que a associação relatada por Tesauro *et al.* (2000) pode ser atribuída a um artefato metodológico ocorrido durante a preparação das amostras. Com isso, os resultados positivos encontrados nos estudos com o polimorfismo 894G>T foram atribuídos ao desequilíbrio de ligação entre este polimorfismo e as outras variantes funcionais no gene da eNOS, como o polimorfismo -786T>C na região promotora, para o qual existem evidências consistentes de que se trata de uma variante funcional (Nakayama *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2000).

Outro exemplo que ressalta a importância da seleção criteriosa dos genes candidatos é ilustrado pelo polimorfismo -1152C>A na região promotora do gene do RAGE (Poirier *et al.*, 2001). Como comentado na seção 1.4.3, o gene do RAGE localiza-se numa região caracterizada pela sobreposição de genes (Sugaya *et al.*, 1994). Parte da região 5'-UTR do

gene do RAGE compõe a região 3'-UTR do gene PBX2, que codifica um fator de transcrição envolvido em tumores. Além disso, o gene PBX2 possui um pseudogene no cromossomo 3 (Hudson *et al.*, 2001c). Em 2001, um estudo relatou a identificação de novos polimorfismos no gene do RAGE, dentre os quais o polimorfismo -1152C>A. Os autores também verificaram que o alelo -1152A conferia um efeito protetor contra a ND em pacientes com DM1 (Poirier *et al.*, 2001). No mesmo ano, Hudson *et al.* (2001c) publicaram um estudo relatando os erros de interpretação cometidos por Poirier *et al.* (2001) e alertando para o cuidado que deve existir ao relatar variantes dos genes do RAGE relacionadas às complicações do DM, devido à existência do pseudogene no cromossomo 3. Hudson *et al.* (2001c) demonstraram que o polimorfismo -1152C>A não existe, pois Poirier *et al.* (2001) detectaram a variação existente entre a região promotora do gene do RAGE e a região homóloga do pseudogene. Caso o estudo de Hudson *et al.* (2001c) não tivesse sido realizado, provavelmente hoje veríamos vários trabalhos discrepantes sobre a associação do “polimorfismo -1152C>A” e as complicações do DM.

Assim, a seleção dos genes candidatos analisados na presente tese foi baseada nos seguintes critérios:

- (1) Genes que codificam produtos essenciais para a homeostasia vascular e que exercem diversas funções fisiológicas;
- (2) Polimorfismos recentemente identificados e/ou com evidências experimentais quanto ao seu impacto nos níveis e/ou a atividade da proteína em questão;
- (3) Variantes localizadas na região promotora ou codificadora dos genes;
- (4) Evidências de que os mesmos poderiam estar associados com as três complicações investigadas na presente tese (RD, ND e CI).

8.3.3. O tamanho amostral

Considerando um modelo ideal de seleção de marcadores genéticos, no qual o marcador apresentaria uma frequência relativamente alta na população, a detecção dos efeitos de um OR (“odds ratio” ou razão de chances) entre 2 a 3 exigiria aproximadamente 500 a 1000 indivíduos (casos e controles). No entanto, para a detecção de efeitos menores (OR = 1,2 a 1,3) seriam necessários aproximadamente 5000 casos e controles. Considerando a existência de fatores como o padrão de desequilíbrio de ligação, a interação entre diferentes genes (epistasia), a interação gene-ambiente, a heterogeneidade alélica e de loco, a influência dos fatores epigenéticos, e o número elevado de múltiplas comparações, o número de indivíduos requeridos para o estudo eleva-se significativamente (Cardon e Bell, 2001; Zondervan e Cardon, 2004). Excetuando os grandes estudos multicêntricos internacionais, a seleção e obtenção de amostras de acordo com as estimativas teóricas é inviável na maior parte dos centros de pesquisa no mundo.

Uma meta-análise recente envolvendo 301 estudos de associação relacionados à genética das doenças complexas revelou que existem muitas variantes genéticas comuns que exercem efeitos moderados como fatores de risco para a doença em questão, e que os estudos com elevados números amostrais podem identificar essas variantes (Lohmueller *et al.*, 2003). Vários autores propuseram que para facilitar tais meta-análises e minimizar os vieses de publicação, todos os estudos de associação que apresentam um padrão mínimo de qualidade devem ser publicados. As publicações devem incluir a definição precisa do fenótipo sob estudo, a citação completa de todos os fenótipos analisados e de todos os testes realizados, entre outros aspectos (Cardon e Bell, 2001; Lohmueller *et al.*, 2003).

Foi estimado que aproximadamente 25% das associações previamente relatadas representam associações reais com a doença. Então, a utilização de grandes tamanhos amostrais para testar todas as associações previamente publicadas pode auxiliar na identificação de um número significativo de variantes que afetam o risco de desenvolvimento da doença multifatorial (Lohmueller *et al.*, 2003).

8.3.4. A estratificação populacional

Outro fator comum que contribui para a ocorrência tanto de resultados falso-positivos quanto falso-negativos é a estratificação populacional, que refere-se à presença de vários subgrupos com frequências alélicas diferentes em uma população. As diferenças nas frequências alélicas nos subgrupos amostrais podem ser independentes da doença e podem levar a conclusões errôneas sobre o desequilíbrio de ligação e o efeito no risco da doença. Uma causa freqüente de estratificação populacional é a existência de diversidade étnica em uma determinada população (Cardon e Bell, 2001).

Embora o estudo de associação baseado no teste de desequilíbrio de transmissão seja mais robusto na presença de estratificação populacional, as metodologias baseadas em famílias podem ser mais difíceis de aplicar, pois requerem significativamente mais pacientes e famílias do que os estudos de caso-controle. Como os genitores devem ser heterozigotos, deve-se rastrear um grande número de famílias e, com isso, perde-se a informação genotípica fornecida pelas famílias que não se enquadram neste critério, levando à perda de poder estatístico para a detecção da associação alélica. Além disso, para as doenças de início tardio, como é o caso do DM2, a obtenção de trios (pais-probando) é virtualmente impossível (Cardon e Bell, 2001).

Em um futuro próximo, a estratificação populacional devido à heterogeneidade étnica será minimizada com a identificação de marcadores de informação de ancestralidade (AIMs). Os AIMs são locos com alelos que apresentam grandes diferenças nas suas freqüências entre as diversas populações. Então eles podem ser utilizados para estimar a ancestralidade ao nível populacional, de subgrupos (por exemplo, casos e controles) e ao nível individual (Kittles e Weiss, 2003). Isto será particularmente relevante para uma população multiétnica, como a população brasileira (Parra *et al.*, 2003).

8.3.5. O tempo de duração do DM

Além das limitações e exigências dos estudos de associação do tipo caso-controle em geral, outro fator fundamental para a correta interpretação dos resultados obtidos em relação às complicações vasculares do DM se refere ao tempo de duração do DM. Sob determinadas condições, um equívoco na forma de lidar com o tempo de DM pode gerar tanto resultados falso-positivos quanto falso-negativos (Rogus *et al.*, 2002).

Os estudos de associação relacionados à genética das complicações crônicas do DM publicados nos últimos cinco anos apresentam uma ampla variabilidade com respeito à coleta dos dados sobre o tempo de duração do DM, às metodologias utilizadas para tratar da questão do tempo de duração do DM, e à discussão de como esta variável pode ter influenciado os resultados (Rogus *et al.*, 2002).

Em geral, duas estratégias básicas têm sido utilizadas. A primeira envolve a seleção de indivíduos controles de acordo o tempo de DM. Na maioria dos estudos, os controles deveriam ter longo tempo de DM, mas estudos pareados por tempo de duração do DM

também foram usados. A segunda estratégia envolve a inclusão do tempo de DM como uma variável a ser considerada na análise dos dados obtidos. Em alguns estudos, a duração foi tratada como uma variável independente e em outros o tempo de DM foi incluído como uma variável de estratificação para a análise (casos de longa duração comparados aos controles de longa duração e casos com curta duração comparados aos controles de curta duração) (Rogus *et al.*, 2002).

Morton e Collins (1998) sugeriram outras formas de aumentar a eficiência dos estudos de caso-controle, que incluem a seleção de casos com uma história familiar positiva e controles com um perfil metabólico deletério (como por exemplo, controle glicêmico deficiente e presença de hipertensão). Estes últimos, denominados de “controles hipernormais”, seriam os indivíduos que apresentam uma série de fatores de risco predisponentes à complicação vascular, mas mesmo assim são resistentes ao desenvolvimento destas complicações (Morton e Collins, 1998).

Conforme discutido por Rogus *et al.* (2002), não existe um consenso sobre a melhor abordagem para lidar com a questão do tempo de DM nos estudos de genética das complicações. Assim, sugere-se que a interpretação do estudo deve levar em consideração o impacto do tempo de DM nos resultados obtidos. Na presente tese, adotamos o critério de incluir somente controles com no mínimo 10 anos de DM para evitar a inclusão de casos potenciais na amostra controle, o que poderia levar à diluição das associações observadas e aos resultados falso-negativos. Nos estágios tardios das complicações crônicas, o aumento na mortalidade decorrente da doença renal crônica terminal ou dos eventos cardiovasculares poderia afetar a distribuição genotípica dos genes envolvidos na susceptibilidade às complicações, bem como os genes envolvidos na sobrevivência diferencial dos pacientes. Como não existem análises de sobrevivência para os

polimorfismos analisados no presente estudo, não podemos avaliar se houve um viés de mortalidade, nos quais os pacientes portadores dos alelos de risco teriam morrido precocemente.

8.3.6. A coexistência das complicações crônicas

Existe atualmente uma discussão na literatura a respeito do significado da coexistência das complicações crônicas no paciente diabético (Arroyo, 2002). A taxa de concordância entre essas complicações é alta e tem sido observada em todas as populações analisadas. Em nosso estudo, por exemplo, entre os pacientes com ND 76% também apresentavam RD, enquanto que entre os pacientes com RD, 58% também tinham CI. A questão a ser definida é se a ocorrência de duas ou mais complicações no mesmo paciente reflete um estado generalizado de disfunção endotelial (a presença de uma complicação serve de marcador para uma segunda complicação) ou se a presença de uma complicação se constitui em fator de risco para uma outra complicação (Arroyo, 2002; Bozza *et al.*, 2004), como tem sido relatado para a microalbuminúria e a doença cardiovascular (Gray e Yudkin, 2004; Bo *et al.*, 2005).

O paralelismo existente nas alterações morfológicas e fisiológicas que ocorrem na RD, na ND e na CI evidenciam a ocorrência de mecanismos comuns que levam à disfunção endotelial característica destas complicações, como mencionado no item 1.3.3. Além da ND e da CI, para as quais já se reconhecia o processo inflamatório como parte dos mecanismos envolvidos na sua patogênese, recentemente foi proposto que a RD também seria uma doença inflamatória (Adamis, 2002; Joussen *et al.*, 2004).

Esses fatos remetem a duas questões importantes. Primeiro, considerando que existem mecanismos comuns que levam às complicações crônicas, então as variantes genéticas de susceptibilidade para essas complicações codificam produtos que atuam ao nível sistêmico. Segundo, os genes/alelos de susceptibilidade para as complicações crônicas são comuns ou existem alelos de susceptibilidade específicos para as diferentes complicações?

Além disso, existe outro fator de confusão no estudo das complicações crônicas do DM, que é intrínseco à patogênese das complicações, e que contribui para os resultados conflitantes na literatura. Considerando a complexidade dos mecanismos que desencadeiam a ocorrência ou a progressão das complicações, tem sido reconhecido que diferentes alelos de susceptibilidade podem atuar em diferentes estágios da complicação crônica, como relatado para a ND (Sivenius *et al.*, 2004).

Os dados obtidos no presente estudo corroboram esta hipótese, pois o genótipo –106CC (polimorfismo –106C>T no gene da AR) revelou-se como um fator de risco para a RD proliferativa, mas não para a presença de qualquer grau de RD. Porém, o alelo –106C esteve associado tanto à presença quanto à progressão para a nefropatia clínica. Já o alelo 242T (polimorfismo 242C>T no gene CYBA) estava associado à progressão para a nefropatia clínica. Então, mesmo que os alelos de risco/proteção contribuam para a patogênese de várias complicações, seus efeitos podem atuar de formas diversas nos diferentes estágios das complicações crônicas.

Enquanto a controvérsia persiste, alguns autores têm proposto que a investigação das complicações crônicas somente é válida se todas as complicações forem avaliadas simultaneamente (Gray e Yudkin, 2004). Uma proporção considerável dos trabalhos recentemente publicados referentes aos estudos de associação com genes candidatos têm discutido a relação entre um polimorfismo e a RD e/ou a ND, sem considerar a ocorrência de CI nos pacientes sob estudo. Da mesma forma, os estudos de associação que examinam a CI como o desfecho clínico, em geral não levam em consideração a presença de complicações microvasculares. No presente estudo, alguns polimorfismos foram associados a algumas das complicações na regressão univariada (como por exemplo, o polimorfismo -429T>C no gene do RAGE), quando de fato estavam refletindo apenas a correlação do polimorfismo em questão com a outra complicação coexistente, como discutido nas seções anteriores. Portanto, a coexistência de complicações pode contribuir para os resultados discrepantes observados entre os diversos estudos de associação.

Desta forma, existe uma ampla variação entre os diversos estudos quanto à coexistência de complicações e ao tempo de DM como critérios de seleção dos pacientes. Em relação à coexistência de complicações, alguns autores requerem que os pacientes com RD sejam normoalbuminúricos (para evitar confusão na interpretação dos resultados positivos), enquanto os indivíduos com ND também devem ter RD (para confirmar que a ND se deve ao DM) (Hodgkinson *et al.*, 2002). Outros autores, no entanto, preferem selecionar casos que tenham RD e ND simultaneamente e controles sem nenhuma complicação microvascular (Murata *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003).

8.3.7. Os exames e os critérios diagnósticos das complicações crônicas

Em relação aos exames e critérios diagnósticos das complicações crônicas, o método tradicionalmente recomendado para o diagnóstico da RD é a fotografia digital estereoscópica do fundo de olho. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que o exame clínico de fundo de olho (oftalmoscopia indireta), seguida de biomicroscopia, embora menos sensível que a fotografia, apresenta uma maior eficiência na detecção do espessamento retiniano causado pelo edema macular e na detecção do início da neovascularização. Atualmente os dois métodos são considerados adequados (Fong *et al.*, 2003).

Além desses métodos, alguns autores utilizam fotografia digital não estereoscópica, sem dilatação das pupilas, pois a consideram um método rápido e cômodo para o paciente, já que não requer a dilatação das pupilas, e prático, pois não precisa ser feito por um oftalmologista especialista em retina. No entanto, uma fração considerável das lesões retinianas podem não ser detectadas, já que a região periférica da retina não é visualizada e as fotos não apresentam uma resolução adequada o suficiente para detectar as alterações iniciais da RD, como os microaneurismas, e o edema macular que também pode ocorrer nos pacientes com DM (van Leiden *et al.*, 2003).

Quanto à ND, os estudos variam em diversos aspectos, incluindo o método de coleta de urina, a qualidade da análise da albumina e o modo de expressão da albuminúria. Quanto à coleta das amostras de urina, em alguns trabalhos é coletada apenas uma amostra isolada de urina, enquanto em outros, a urina é coletada em um determinado período, como durante o dia ou a noite, ou durante 24 horas. Também existem várias formas de expressar a excreção de albumina (taxa de excreção de albumina urinária, taxa albumina/creatinina,

concentração de albumina urinária), assim como a análise pode ser quantitativa, semi-quantitativa ou qualitativa (Gross *et al.*, 2005).

A fim de resolver esta heterogeneidade, Gross *et al.* (1999) propuseram um algoritmo no qual os pacientes, ao invés de se submeterem à coleta de urina de 24 horas, que é pouco prático, dispendioso e muitos não o fazem como recomendado, seria mais apropriado fazer uma triagem com uma amostra casual de urina e se houver evidência de proteinúria clínica, solicitar um exame de urina de 24 horas para confirmar o resultado.

Em relação à doença cardiovascular no DM2, os termos “doença arterial coronariana” e “cardiopatia isquêmica” têm sido utilizados como sinônimos (Stocker e Keaney Jr., 2004). Alternativamente, alguns autores utilizam a medida do espessamento da camada íntima-média da carótida (IMT) como um desfecho substituto para a DAC (Melidonis *et al.*, 2003). Além disso, a definição de isquemia miocárdica silenciosa utilizada nesses estudos é variável. Alguns autores incluem pacientes sem sintomas clínicos mas com evidências de infarto ou isquemia prévia fornecidas pelo eletrocardiograma de repouso. Outros pesquisadores incluem pacientes com sintomas atípicos e outros restringem a definição aos pacientes assintomáticos com testes funcionais positivos ou com DAC angiograficamente documentada (Gray e Yudkin, 2004).

Conforme mencionado anteriormente, os pacientes com DM podem desenvolver CI mesmo na ausência de estenoses coronarianas. Portanto, consideramos o termo CI mais apropriado para o propósito da presente tese. Como o critério para a definição de CI utilizado baseou-se no diagnóstico clínico, é possível que haja uma superestimativa da freqüência de CI detectada nos pacientes com DM2, de forma que alguns pacientes sem anormalidades poderiam ter sido incluídos como casos. Porém, esta abordagem levaria à diluição dos resultados positivos encontrados.

8.3.8. O viés de publicação

Outro fator que contribui para os resultados discrepantes refere-se ao viés de publicação, no qual os estudos com resultados estatisticamente significativos são preferencialmente publicados em detrimento dos estudos que não encontram nenhuma relação entre o gene candidato e a doença em questão (Lohmueller *et al.*, 2003).

8.3.9. A disfunção endotelial

O elevado número de estudos clínicos e experimentais relacionados à fisiopatologia da vasodilatação dependente do endotélio no DM, e a discrepância dos resultados obtidos evidenciaram a complexidade dos mecanismos que levam à disfunção endotelial. Várias vias metabólicas apresentam efeitos comuns na homeostasia da célula endotelial. Além disso, a susceptibilidade tissular aos efeitos deletérios da hiperglicemia pode variar. Por fim, os mecanismos da vasodilatação dependente do endotélio podem ser completamente diferentes de acordo com o diâmetro do vaso e sua localização anatômica. Assim, os resultados têm variado conforme o modelo experimental utilizado (De Vriese *et al.*, 2000).

Os modelos animais atualmente mais utilizados são os camundongos com DM induzido por estreptozotocina (DM tipo 1). Como a patogênese da doença vascular nos dois principais tipos de DM pode diferir enormemente, os modelos animais de DM2 são mais adequados para a caracterização da disfunção endotelial. Em humanos, outro fator de heterogeneidade é o enfoque dos estudos experimentais nas grandes artérias, tais como a aorta, ao passo que os estudos clínicos são em grande parte conduzidos na circulação do

antebraço. Assim, seria mais relevante investigar a disfunção endotelial nos principais órgãos afetados pelo DM, como a retina, o rim e o coração (De Vriese *et al.*, 2000).

A função endotelial não pode ser medida diretamente em humanos. As estimativas dos diferentes tipos de disfunção endotelial podem ser obtidas indiretamente pela (1) medida da vasodilatação dependente do endotélio, (2) dos níveis plasmáticos de proteínas derivadas do endotélio (como as moléculas de adesão e as proteínas reativas de fase aguda), e (3) da microalbuminúria (Endemann e Schiffrin, 2004; Stehouwer e Schalkwijk, 2004).

A técnica usualmente utilizada para testar a função endotelial é a vasodilatação dependente do endotélio. Nas artérias coronarianas, ela é realizada angiograficamente pelas medidas do fluxo, através das quais é analisado o efeito dos agonistas dependentes do endotélio, como a acetilcolina, por exemplo. Porém, técnicas não-invasivas também são utilizadas, como a medida da vasodilatação da artéria braquial mediada pelo fluxo induzida pelo “shear stress” por meio do ultra-som. Outros métodos alternativos incluem a medida da disfunção endotelial *in vitro* em artérias obtidas por meio de biópsia e a dosagem de marcadores de disfunção endotelial no plasma (Endemann e Schiffrin, 2004).

8.3.10. O estresse oxidativo

Como os radicais livres são altamente reativos e têm uma meia-vida bastante curta, a determinação dessas moléculas torna-se pouco prática do ponto de vista técnico, e a alternativa é estudar o estresse oxidativo indiretamente através da análise de produtos mais estáveis formados pelos radicais livres (Tarpey e Fridovich, 2001). O NO, por exemplo, é rapidamente convertido aos ânions nitrito e nitrato ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$), denominados de

metabólitos NO_x. Os níveis plasmáticos desses metabólitos, que são quimicamente mais estáveis, podem ser determinados como uma medida da atividade da eNOS (Kone, 1997).

No entanto, a mensuração do estresse oxidativo *in vivo* é tecnicamente pouco acurada, devido principalmente à baixa especificidade e reprodutibilidade dos métodos utilizados (Tarpey e Fridovich, 2001; Stehouwer e Schalkwijk, 2004). Nenhuma técnica até o momento desenvolvida tem a capacidade de quantificar a formação de determinadas EROs sob todas as circunstâncias (Tarpey e Fridovich, 2001).

Embora a dosagem de proteínas ou metabólitos secundários seja uma etapa importante para a compreensão do efeito do polimorfismo sobre os níveis e/ou a atividade da proteína em questão, a existência de problemas técnicos, tais como a seleção dos pacientes, a coleta apropriada da amostra, a estabilidade das proteínas analisadas, e a complexa operacionalização do processo coleta-dosagem fazem com que esta abordagem seja de difícil aplicabilidade no estudo de associação genética.

8.4. Os estudos de associação com haplótipos

Embora mais de 4 milhões de SNPs (aproximadamente um a cada 1-2 kb) já tenham sido identificados pelo “Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Consortium” (Tishkoff e Williams, 2002), o desequilíbrio de ligação (LD) existente entre os marcadores genéticos em uma determinada região do cromossomo pode ser usado para reduzir o número de marcadores que precisam ser analisados (Zhao *et al.*, 2003).

Os estudos epidemiológicos e de simulação demonstram que a análise de haplótipos pode fornecer evidências mais consistentes sobre a associação de uma determinada região do genoma com o fenótipo clínico, do que as análises individualizadas dos marcadores, já

que os haplótipos geralmente são mais informativos (maior heterozigosidade) do que cada um dos SNPs bialélicos isoladamente (Cardon e Bell, 2001; Stephens *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003).

No presente estudo, a análise dos haplótipos no gene do RAGE corroborou o resultado inicial de que o alelo -374A estava associado ao risco reduzido de CI em negróides, indicando que a associação encontrada para o alelo -429C na análise univariada foi decorrente do LD existente entre os polimorfismos -429T>C e -374T>A.

Em relação aos polimorfismos no gene da PON1, esta diferença no poder de detectar uma associação entre as duas abordagens se tornou ainda mais evidente, e poderia explicar a discrepância observada na literatura. Em negróides, os alelos -108C e 192R foram mais frequentes nos pacientes com RD e ND do que nos pacientes sem essas complicações, mas na análise multivariada constatou-se que estes alelos não estavam associados às complicações microvasculares. No entanto, o haplótipo que contém os alelos -108C e 192R aumenta o risco de desenvolvimento da RD e da ND em negróides. Se essa abordagem não tivesse sido realizada, os polimorfismos no gene da PON1 seriam considerados irrelevantes para a susceptibilidade às complicações crônicas microvasculares do DM.

Uma análise de aproximadamente 4000 SNPs distribuídos em 313 genes nucleares em caucasóides, afro-americanos, asiáticos e hispano-americanos demonstrou que existem SNPs e haplótipos que são população-específicos, enquanto os que são comuns a todas as populações (SNPs “cosmopolitas”) apresentam uma imensa variabilidade nas frequências alélicas entre as diferentes populações (Stephens *et al.*, 2001; Gabriel *et al.*, 2002).

As análises filogenéticas em populações de origem européia, asiática e africana têm revelado vários padrões, que podem ser sumariados como segue:

(1) A variabilidade genética é, em média, duas vezes maior em populações afro-descendentes do que em derivados de europeus e asiáticos (Stephens *et al.*, 2001; Gabriel *et al.*, 2002; Kittles e Weiss, 2003).

(2) As populações européias e asiáticas apresentam um padrão similar de variabilidade haplotípica. As linhagens mais ancestrais são afro-específicas e todas as linhagens não africanas podem ser derivadas de um único haplogrupo ancestral africano. Assim, as populações européias e asiáticas possuem somente um subconjunto da diversidade genética presente na África (Gabriel *et al.*, 2002; Tishkoff e Williams, 2002).

(3) Os afro-americanos apresentam o maior número de alelos raros e de haplótipos população-específicos, comparados aos caucasóides, asiáticos e hispano-americanos (Stephens *et al.*, 2001; Tishkoff e Williams, 2002).

(4) O desequilíbrio de ligação em populações caucasóides e asiáticas é muito maior quando comparadas às populações africanas e afro-americanas, enquanto as populações isoladas apresentam LD ao longo de extensas regiões do genoma (Wall e Pritchard, 2003).

Os estudos evolutivos demonstraram que o LD entre dois SNPs é influenciado por diversos fatores, tais como o tempo de surgimento das mutações, a história populacional, as taxas de recombinação, o fluxo gênico, a deriva genética e a seleção natural (Cardon e Bell, 2001; Tishkoff e Williams, 2002; Wall e Pritchard, 2003; Zhao *et al.*, 2003; Zondervan e Cardon, 2004). Assim, o padrão de LD varia enormemente entre as diferentes regiões do genoma (Wall e Pritchard, 2003), de forma que o desequilíbrio de ligação entre dois polimorfismos não pode ser predito somente pela distância física entre eles (Stephens *et al.*, 2001; Zondervan e Cardon, 2004). Por exemplo, pares de SNPs que estão acima de 20 kb de distância podem estar em LD completo, enquanto outros na mesma região cromossômica podem estar em LD fraco ou até mesmo estar em equilíbrio de ligação (Wall e Pritchard, 2003). Portanto, o padrão de desequilíbrio de ligação é loco- e população-específico (Cardon e Bell, 2001; Tishkoff e Williams, 2002; Wall e Pritchard, 2003; Zhao *et al.*, 2003; Zondervan e Cardon, 2004).

Considerando os aspectos mencionados acima, a caracterização do padrão de LD e da estrutura haplotípica em diferentes populações são etapas fundamentais para os estudos de mapeamento genético das doenças multifatoriais (Cardon e Bell, 2001; Stephens *et al.*, 2001; Gabriel *et al.*, 2002; Wall e Pritchard, 2003; Zhao *et al.*, 2003). Para isso, deve-se genotipar uma alta densidade de marcadores polimórficos em uma amostra suficientemente grande para a análise dos padrões de recombinação através desta região (Gabriel *et al.*, 2002).

8.4.1. Os blocos haplotípicos

Os estudos de caracterização dos padrões haplotípicos em 51 regiões autossômicas, com aproximadamente 4000 SNPs, em iorubas (Nigéria), afro-americanos, e indivíduos de origem europeia e asiática (japoneses e chineses) encontraram fortes evidências de que a maior parte do genoma humano está estruturado de tal forma que cada cromossomo pode ser dividido em muitos blocos, de tamanho considerável, dentro dos quais há reduzida diversidade haplotípica (3 a 5 haplótipos). Estes blocos são separados por regiões caracterizadas por “hotspots” de recombinação (Gabriel *et al.*, 2002; Wall e Pritchard, 2003; Zhao *et al.*, 2003). Além do MHC de classe II, as estruturas de blocos haplotípicos também foram encontradas ao longo dos cromossomos 21 e 22 (Zhao *et al.*, 2003) e do gene da PON1 (Jarvik *et al.*, 2003).

As populações jovens, as endogâmicas e as que passaram por eventos recentes de “bottleneck” possuem blocos haplotípicos cujo tamanho varia de moderado a grande. Já nas populações mais antigas e com tamanho efetivo maior, o tamanho dos blocos haplotípicos é menor devido à maior ocorrência de recombinação (Tishkoff e Williams, 2002). Por exemplo, nos afro-americanos e nos iorubas o tamanho médio do bloco haplotípico é de 9 kb (podendo variar de < 1kb até 94 kb), ao passo que a média em europeus e asiáticos é de 18 kb (variando de < 1 kb até 173 kb) (Gabriel *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003).

Foi proposto que a estrutura de blocos haplotípicos pode ser vantajosa para os estudos de associação, pois cada bloco haplotípico pode ser considerado como um loco com vários alelos (os haplótipos bloco-específicos) nos estudos de associação. Contudo, o

resultado depende da definição de bloco haplotípico, e tais métodos podem não ser os mais eficientes se houver um considerável LD entre os alelos de diferentes blocos, como tem sido sugerido em diversos estudos (Gabriel *et al.*, 2002; Wall e Pritchard, 2003; Zhao *et al.*, 2003).

Após a primeira fase do mapeamento, na qual um único bloco haplotípico de interesse tenha sido identificado, o padrão de LD pode não ser informativo para a localização da variante ligada à doença em estudo. Considerando os altos níveis de diversidade genética observados nas populações africanas e sua história demográfica, uma abordagem possível é a detecção inicial em populações não-africanas, pois o LD em uma extensão maior do genoma pode favorecer a localização inicial e, conseqüentemente, a realização de um mapeamento mais refinado (“fine-mapping”) das doenças genéticas complexas em população africanas ou afro-descendentes, nas quais a taxa de LD decai mais rapidamente, assumindo que os mesmos locos de predisposição à doença são polimórficos em ambos os grupos (Gabriel *et al.*, 2002; Wall e Pritchard, 2003).

8.5. Os estudos de associação em populações de origem africana

O presente estudo é um dos poucos a analisar uma população afro-descendente em relação à associação de variantes genéticas com as complicações crônicas no DM2. Como já reconhecido por outros autores, a maioria dos estudos com polimorfismos têm sido realizados em populações européias, norte-americanas e asiáticas (predominantemente China e Japão), e pouco se conhece sobre os alelos que conferem susceptibilidade para diversas doenças, inclusive as monogênicas (Tishkoff e Williams, 2002).

Geneticistas e antropólogos têm debatido sobre a tendência denominada de “Europe First”, que refere-se à existência de um viés na identificação e análise de SNPs, pois a maior parte dos estudos com variantes genéticas são realizados nas populações europeias (Kittles e Weiss, 2003). Como há uma grande variabilidade genética entre diferentes populações, discute-se a importância do seqüenciamento de amostras provenientes de outros grupos étnicos para identificar novas variações que possam ser pertinentes a estas populações, ao invés de assumir a premissa de que os alelos de predisposição à doença são comuns a todos os grupos étnicos, e examinar a variação existente em outras populações testando-se somente os alelos identificados em europeus (Kittles e Weiss, 2003).

Com exceção das variantes nos genes da PON1 e da eNOS, para as quais existem alguns estudos populacionais e de associação, os demais polimorfismos analisados na presente tese não foram estudados em nenhuma outra população afro-descendente.

Um exemplo que destaca a necessidade da realização de estudos de associação em diferentes populações humanas é ilustrada pelo polimorfismo P12A no gene do PPAR γ (envolvido na regulação da diferenciação dos adipócitos). Tem sido observado que o alelo A está associado ao risco reduzido de desenvolvimento de DM2. Como este polimorfismo não foi encontrado em populações africanas, é importante ressaltar que os resultados obtidos em uma determinada população não podem ser extrapolados para outras populações com diferentes “backgrounds” genéticos e características clínicas e metabólicas (Kittles e Weiss, 2003).

8.6. A interação gene-gene e gene-ambiente

Mesmo que dois diferentes grupos étnicos compartilhem o mesmo alelo de predisposição à doença, o “background” genético de indivíduos com diferentes ancestralidades pode diferir, com a conseqüente variação na severidade da doença. Os estudos em humanos e modelos animais têm fornecido fortes evidências de que os efeitos genéticos podem depender do “background” genômico (Kittles e Weiss, 2003). Isso explicaria em parte o porquê do haplótipo –108C/192R estar associado ao risco aumentado de RD e ND em negróides, mas não em caucasóides, no presente estudo. Um estudo em caucasóides americanos observou que a atividade da paraoxonase era um forte preditor de doença vascular, mas a estrutura de LD baseada em 4 polimorfismos não apresentava qualquer evidência de associação com a DAC (Jarvik *et al.*, 2003).

Para a maioria das doenças tem se demonstrado que o mesmo genótipo pode exercer efeitos muito diversos em diferentes condições ambientais (Kittles e Weiss, 2003). Apesar disso, a maior parte dos estudos de associação ainda não consideram efeitos ambientais, nem a influência das interações gene-ambiente, que podem ser essenciais para a análise das doenças complexas (Cardon e Bell, 2001).

Uma variante relacionada à função cardíaca, por exemplo, pode não ser importante em indivíduos jovens, mas pode se tornar significativa em indivíduos com idade avançada, quando o coração já apresenta deficiência fisiológica (Tracy, 2004). No caso do polimorfismo –108T>C no gene da PON1, o alelo –108C foi associado ao aumento de risco para a CI em caucasóides, somente entre os indivíduos com menos de 54 anos. A interação entre este polimorfismo e a idade já havia sido observada em um estudo em suíços com DAC (Leviev *et al.*, 2001b).

A interação com o fumo também foi evidente para os polimorfismos Q192R (PON1) e 242C>T (NAD(P)H oxidase). Como discutido nos capítulos anteriores, o efeito do polimorfismo em adição ao efeito deletério do fumo fazem com que esta combinação de fatores de risco seja predisponente às complicações do DM. Em relação ao gene da PON1, este efeito de interação já é bastante conhecido em pacientes com IAM, independentemente da presença de DM (Sen-Banerjee *et al.*, 2000; Senti *et al.*, 2000). Assim, a análise desta interação deveria ser uma constante nos estudos de associação dos polimorfismos da PON1.

Provavelmente também ocorrem efeitos de interação em neutrófilos. Porém, como discutido anteriormente, o número reduzido de neutrófilos estudados no presente trabalho não permitiu esta comparação.

8.7. A paraoxonase 1 (PON1)

Entre os polimorfismos que apresentaram evidências de associação com as complicações do DM, as variantes da PON1 foram as que apresentaram um maior número de associações e revelaram importantes implicações para os estudos de caso-controle.

Os estudos evolutivos têm observado que a diversidade nucleotídica, medida pelo número médio de sítios heterozigotos por nucleotídeo, é quatro vezes menor em humanos em comparação a outros primatas (Kittles e Weiss, 2003; Koda *et al.*, 2004). No entanto, um estudo recente demonstrou que o gene da PON1 é uma exceção, para o qual a diversidade é maior em humanos do que em chimpanzés e orangotangos. A alta variabilidade no gene da PON1 sugere que esta proteína desempenha um papel fisiológico essencial.

O polimorfismo -108T>C no promotor do gene da PON1 tem sido predominantemente analisado em populações caucasóides, nas quais os alelos -108T e C apresentam frequências próximas a 50% (Leviev e James, 2000; Brophy *et al.*, 2001), sugerindo que o polimorfismo tem sido mantido por seleção balanceadora (Koda *et al.*, 2004). Já o alelo 192R (polimorfismo Q192R), que predomina nas populações de origem asiática e africana, é o alelo ancestral, enquanto o alelo 192Q, predominante nas populações caucasóides, é exclusivo da espécie humana, pois não ocorre em nenhuma outra espécie de mamífero (Koda *et al.*, 2004).

Considerando que o polimorfismo Q192R é substrato-dependente, ambos os alelos podem ser importantes para a degradação de substratos tóxicos, dependendo da substância a qual o indivíduo é exposto em um determinado momento. De fato, os estudos experimentais *in vitro* observaram que o alelo 192Q inibiu a peroxidação do colesterol LDL quando a PON foi administrada antes da indução da oxidação por íons cobre. Porém, o alelo 192R foi responsável pela inibição da oxidação do LDL quando a PON foi administrada após a indução da oxidação pelo cobre (Li *et al.*, 2003). Embora os substratos utilizados nos estudos epidemiológicos sejam sintéticos, foi sugerido que os substratos endógenos da PON1 incluem a PAF-acetilhidrolase (Rodrigo *et al.*, 2001) e a homocisteína-tiolactona (Janel *et al.*, 2004), ambas envolvidas na oxidação de lipídios.

Como mencionado anteriormente, o alelo 192R está associado a um perfil aterogênico e à ocorrência de eventos cardiovasculares. No entanto, um recente estudo demonstrou que o genótipo 192RR estava associado à maior longevidade observada em irlandeses nonagenários e italianos centenários saudáveis (Rea *et al.*, 2004). Portanto, estes fatos revelaram um aparente paradoxo: se o alelo 192R causa uma maior mortalidade devido aos seus efeitos aterogênicos, como pode contribuir para uma maior longevidade?

Uma das hipóteses é que o aumento na metabolização de substâncias químicas potencialmente tóxicas aos quais os indivíduos são expostos ao longo da vida, determinada pelo alelo 192R, supera o risco cardiovascular, conferindo uma vantagem seletiva. Como a família das PONs são altamente conservadas entre os mamíferos (Primo-Parmo *et al.*, 1996), é possível que o papel fisiológico destas proteínas seja muito mais amplo e antigo do que a ocorrência de doença cardiovascular no homem moderno, como discutido por Rea *et al.* (2004).

Além disso, um estudo em sicilianos octogenários detectou que o genótipo -108CC estava associado à maior longevidade (Campo *et al.*, 2004). Outra possibilidade é que o alelo -108C, que confere maiores níveis séricos de PON, esteja em desequilíbrio de ligação com o alelo 192R, de forma que o estudo irlandês observou uma maior longevidade associada ao alelo 192R como um reflexo da maior longevidade conferida pelo polimorfismo no promotor do gene da PON1. Um estudo recente em dinamarqueses constatou que os indivíduos homozigotos para o alelo 192R apresentavam uma taxa de mortalidade maior do que os homozigotos QQ, ao passo que não foi detectado nenhum efeito do polimorfismo -108T>C na sobrevivência (Christiansen *et al.*, 2004a).

8.8. A eNOS e a NAD(P)H oxidase

No presente estudo, não foi detectada qualquer evidência de associação entre os polimorfismos -786T>C e 894G>T no gene da eNOS e as complicações crônicas do DM. Da mesma forma, as frequências haplotípicas não diferiram entre os casos e os controles. Embora alguns estudos tenham demonstrado que existe uma interação entre as variantes

genéticas no gene da eNOS e o tabagismo (Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002), este efeito não foi detectado na presente tese. Uma meta-análise recente de 26 estudos de associação demonstrou que estes polimorfismos não se constituem em fatores de risco para a CI (Casas *et al.*, 2004).

O alelo 242T (polimorfismo C242T no gene CYBA) foi primeiramente associado a uma reduzida ocorrência de DAC em japoneses (Inoue *et al.*, 1998; Yokoyama *et al.*, 2000), enquanto um estudo *ex vivo* demonstrou que o alelo 242T estava correlacionado aos reduzidos níveis de superóxido. Como discutido anteriormente, o tipo de vaso sanguíneo selecionado e a técnica utilizada para a mensuração do ânion superóxido podem gerar resultados conflitantes, de forma que estas observações devem ser confirmadas por outros estudos.

8.9. A catalase (CAT)

As enzimas de defesa antioxidante constituem um sistema coordenado e balanceado, no qual todos os componentes envolvidos devem ser funcionais e estar presentes numa determinada concentração. A ação de cada enzima depende da ação das outras, de forma que se uma enzima apresentar uma elevada atividade, e as demais proteínas relacionadas forem deficientes, o efeito será similar àquele que seria observado se ambas tivessem a mesma expressão (Halliwell e Gutteridge, 1999). Experimentos relacionados à longevidade com moscas transgênicas (*Drosophila melanogaster*) demonstraram que as moscas que atingiram uma maior longevidade foram aquelas que superexpressavam as enzimas SOD e catalase concomitantemente, enquanto que as que tinham recebido apenas uma dose extra de SOD não viveram mais do que as moscas controles (Bonatto *et al.*, 2004).

Assim como o excesso de EROs pode levar à morte celular, o tratamento excessivo com antioxidantes farmacológicos ou por superexpressão de enzimas endógenas pode reduzir os níveis de EROs abaixo dos níveis necessários para a sobrevivência, desencadeando a via apoptótica (Griendling e Harrison, 1999). Os estudos experimentais demonstraram que a superexpressão da catalase humana nas células do músculo liso vascular levam à redução da síntese de DNA e da proliferação celular e à elevada taxa de apoptose (Brown *et al.*, 1999).

Em relação ao polimorfismo $-262C>T$ no gene da CAT, não observamos evidências de associação com as complicações crônicas do DM, mesmo após a estratificação para os fatores de risco clínicos e metabólicos. Da mesma forma, os estudos realizados em americanos e dinamarqueses não encontraram associação deste polimorfismo com o mal de Alzheimer (Goulas *et al.*, 2002), com a sobrevivência, com as funções cognitivas e com diversas doenças relacionadas aos estresse oxidativo, tais como o DM e a CI (Christiansen *et al.*, 2004b).

Mesmo que o polimorfismo $-262C>T$ alterasse os níveis de catalase, como demonstrado no estudo de suecos doadores de banco de sangue (Forsberg *et al.*, 2001b), este polimorfismo não exerceria um efeito significativo na nossa população de estudo, pois a frequência de homozigotos TT é muito pequena e poucos indivíduos se beneficiariam do efeito protetor do alelo $-262T$.

8.10. A validação dos polimorfismos na população em geral

Considerando os tópicos apresentados neste capítulo, a análise de variantes genéticas em estudos de associação requer que a distribuição das mesmas seja conhecida nas diversas populações. Além dos 703 pacientes com DM2, também foram analisadas amostras provenientes de 200 indivíduos doadores de banco de sangue. Cem amostras são provenientes de caucasóides doadores do RS. Considerando que durante o período de coleta das amostras, apenas 13 indivíduos negróides se apresentaram junto ao banco de sangue, 100 amostras deste grupo étnico foram obtidas de doadores residentes no RJ. As amostras da população em geral são as mesmas utilizadas em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Bandinelli, 2000; Simon *et al.*, 2002; Simon e Roisenberg, 2004). Como a população negróide do RJ pode não ser representativa da população negróide do RS, sempre que uma diferença nas frequências gênicas e/ou genotípicas entre os pacientes com DM2 e os doadores de banco de sangue do RJ foi detectada, os polimorfismos em questão foram genotipados em amostras de negróides normoglicêmicos do RS (gentilmente cedidas pela Prof^a Mara Hutz, UFRGS), para avaliar se a diferença observada se devia à origem da população ou à presença do DM.

As frequências gênicas e genotípicas observadas nos pacientes com DM2 e na população em geral podem ser visualizadas na tabela 2 (anexo III). Analisando-se a distribuição dos polimorfismos nos pacientes com DM2 e na população em geral, pode-se destacar algumas tendências gerais. Em caucasóides, as frequências gênicas e genotípicas obtidas no grupo de pacientes com DM2 não diferiram daquelas observadas na população em geral, com a exceção do polimorfismo -106C>T no gene da AR. Já em negróides, 7

dos 11 polimorfismos estudados apresentaram diferenças nas frequências gênicas e genóticas entre os pacientes com DM2 e os indivíduos da população em geral do RJ. Excetuando o polimorfismo 894G>T, no gene da eNOS, essas diferenças observadas não se atribuem à presença de DM, e sim às diferenças populacionais, como evidenciado pela comparação entre os pacientes com DM2 e os indivíduos normoglicêmicos do RS. Além disso, as frequências gênicas obtidas nos negróides normoglicêmicos são semelhantes às observadas nos pacientes com DM2 ou intermediárias entre as frequências obtidas nos pacientes com DM2 e os doadores de banco de sangue do RJ, como constatado para os polimorfismos do gene do RAGE, da AR, da PON1 e da CAT.

Em relação ao gene do RAGE, as frequências genóticas obtidas para os polimorfismos -429T>C, -374T>A e I/D 63-pb estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos étnicos. O alelo -374A, que se revelou como um fator de proteção contra a cardiopatia isquêmica em negróides com DM2, foi mais frequente em caucasóides do que em negróides. Além disso, é interessante notar a alta frequência do alelo D em negróides (10% nos doadores do RJ e 4% nos pacientes com DM2). Uma hipótese que poderia ser levantada é se o alelo D seria restrito aos indivíduos com ancestralidade africana. Assim sendo, quanto maior a miscigenação com afro-descendentes, maior a frequência do alelo D. Como este é o primeiro estudo envolvendo o polimorfismo I/D 63-pb em uma população afro-descendente, ainda não se pode elucidar o significado deste resultado. Conforme observado por outros autores (Hudson *et al.*, 2001a), os polimorfismos -429T>C e -374T>A estão em completo desequilíbrio de ligação, sendo que o haplótipo duplo mutante -429C/-374A não foi observado nos indivíduos provenientes do Estado do RS (tabela 3; anexo IV).

Quanto ao polimorfismo $-106C>T$ no gene da AR, as frequências genóticas observadas nos pacientes com DM2 não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, pois esperava-se uma frequência maior de indivíduos heterozigotos (tabela 2; anexo III). Além disso, em caucasóides a frequência do alelo T foi significativamente maior nos pacientes com DM2 do que nos doadores de banco de sangue ($p = 0,034$). Para verificar se esse alelo está relacionado à ocorrência de DM *per se*, seria interessante analisar este polimorfismo em caucasóides normoglicêmicos. Um estudo recente também observou que o alelo T era mais frequente em finlandeses com DM2 em comparação aos indivíduos normoglicêmicos (Sivenius *et al.*, 2004).

Em relação ao gene da eNOS, os alelos $-786C$ e $894T$ foram mais frequentes nos caucasóides do que em negróides, como constatado em um estudo populacional em caucasóides, afro-americanos e asiáticos residentes nos EUA (Tanus-Santos *et al.*, 2001). No presente estudo, as frequências genóticas para o polimorfismo $894G>T$ não seguem a distribuição esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em negróides com DM2, nos quais houve um excesso de heterozigotos. Além disso, o alelo $894T$ foi mais frequente nos pacientes com DM2 do que nos indivíduos normoglicêmicos. No entanto, um estudo recente constatou que o alelo $894T$ estava associado à resistência à insulina e ao DM2 em italianos (Monti *et al.*, 2003).

As frequências haplotípicas observadas para os polimorfismos $-786T>C$ e $894G>T$ no presente estudo (tabela 3; anexo IV) são similares às encontradas para estes polimorfismos no trabalho de Tanus-Santos *et al.* (2001), que ressaltaram a variabilidade nas frequências gênicas e haplotípicas entre os diferentes grupos étnicos. O haplótipo mais comum para os caucasóides e os afro-americanos era o que possuía os alelos $-786T$ e

894G, que estavam em LD em caucasóides ($D' = 0,58$). No presente estudo, ambos alelos estavam em LD tanto em caucasóides como em negróides. É interessante notar que entre os negróides o haplótipo duplo mutante ($-786C/894T$) apresentou uma frequência significativamente maior no grupo de pacientes com DM2 do que nos indivíduos doadores de banco de sangue ($p < 0,001$).

As frequências genóticas e haplotípicas observadas para os polimorfismos no gene da PON1 apresentam uma grande variabilidade entre caucasóides e negróides. Em caucasóides, os alelos $-108T$ e $-108C$ apresentam frequências similares, como relatado por outros autores (Leviev e James, 2000; Suehiro *et al.*, 2000; Brophy *et al.*, 2001). Em negróides, porém, o alelo $-108C$ (responsável pelos níveis séricos mais elevados de paraoxonase) é o mais freqüente. Estes são os primeiros resultados referentes a este polimorfismo em uma população afro-descendente. Da mesma forma, o alelo 192Q (polimorfismo Q192R) foi mais freqüente entre os caucasóides, enquanto o alelo 192R foi predominante nos negróides. As frequências dos alelos Q e R foram idênticas às observadas anteriormente em doadores de banco de sangue do Estado do Paraná, para ambos grupos étnicos (Allebrandt *et al.*, 2002).

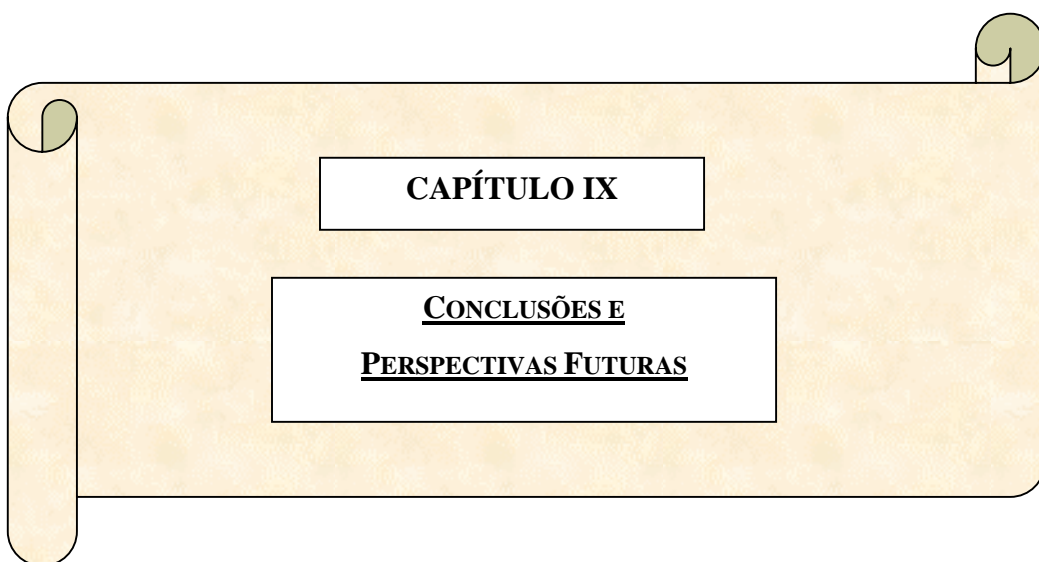
Já o polimorfismo S311C no gene da PON2 (para o qual não foi obtida qualquer evidência de associação com as complicações do DM), apresentou frequências gênicas e genóticas similares entre os quatro grupos de indivíduos analisados neste estudo.

Os alelos ancestrais $-108C$ e 192R estavam em LD em caucasóides com DM2 e nos negróides, sendo que o haplótipo mais ancestral foi o mais freqüente nos negróides, enquanto o haplótipo de origem mais recente foi predominante nos caucasóides. Os demais haplótipos possíveis foram observados em frequências intermediárias. Os polimorfismos $-108T > C$ e S311C estavam em LD em todos os grupos de indivíduos, enquanto os

polimorfismos Q192R e S311C, que estão relativamente mais próximos, não estavam em LD (exceto nos caucasóides com DM2). Ou seja, os três polimorfismos estão em LD nos caucasóides com DM2. Porém, nos demais grupos o padrão de LD é variável. Além do reduzido número de negróides, que pode ter contribuído para esta discrepância no padrão de LD, os resultados obtidos no presente estudo corroboram o modelo de blocos haplotípicos.

O polimorfismo 242C>T foi uma exceção à variabilidade observada para as demais variantes analisadas na presente tese. O alelo 242T apresentou frequências similares entre os quatro grupos de indivíduos, que foram idênticas às frequências observadas em outras populações caucasóides (Cai *et al.*, 1999; Gardemann *et al.*, 1999; Mata-Balaguer *et al.*, 2004). Por fim, o alelo -262T (polimorfismo -262C>T no gene da CAT) foi mais frequente em caucasóides do que em negróides. Porém, esse alelo foi menos frequente em comparação às populações sueca (Forsberg *et al.*, 2001b), norte-americana (Goulas *et al.*, 2002) e dinamarquesa (Christiansen *et al.*, 2004b).

À medida que novos fatores de risco são identificados, os estudos vão se tornando mais complexos em relação às análises dos dados obtidos. Da mesma forma, a definição precisa do fenótipo de interesse está continuamente sendo refinada à medida que mais informações são obtidas a respeito da base molecular dos diferentes subtipos de doença (Cardon e Bell, 2001).



CAPÍTULO IX

CONCLUSÕES E
PERSPECTIVAS FUTURAS

9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A análise realizada a partir dos dados obtidos nos permitiu formular as seguintes conclusões:

(1) Os genes que codificam produtos relacionados à função endotelial e ao balanço redox intracelular se constituem em genes candidatos para a investigação do controle genético na susceptibilidade para as complicações crônicas do DM.

(2) Dos 11 polimorfismos analisados, observou-se que 6 se constituíram em fatores de risco independentes para, pelo menos, uma das complicações investigadas.

(3) Em caucasóides com DM2, o genótipo –106CC (polimorfismo –106C>T no gene da AR) se constituiu em fator de risco para a RD proliferativa.

(4) Os nossos resultados enfatizam a importância de analisar os fatores ambientais que podem interagir com os fatores de risco genéticos na susceptibilidade para as complicações vasculares, pois existem subgrupos de pacientes que são mais propensos ao desenvolvimento das complicações crônicas do DM. Em caucasóides, três importantes fatores de interação foram identificados envolvendo os polimorfismos –108T>C e Q192R, ambos no gene da PON1, e o polimorfismo 242C>T no gene CYBA. O alelo –108C foi associado ao aumento do risco de CI entre os pacientes com menos de 54 anos de idade. Já o alelo 192R foi associado ao risco aumentado de CI entre os fumantes. Por fim, o alelo 242T no gene CYBA se constituiu em fator de risco para a nefropatia clínica nos fumantes.

(5) Em negróides, o alelo -374A no gene do RAGE se revelou como um fator de proteção para a CI, ao passo que o alelo -108T se constituiu em fator de risco para esta complicação. Quanto ao polimorfismo -106C>T, o alelo -106C foi associado ao aumento no risco de ND e de progressão para a nefropatia clínica.

(6) Os resultados obtidos sugerem que a análise de haplótipos pode ser mais profícua do que a análise individualizada de SNPs na identificação das variantes genéticas associadas com as complicações crônicas do DM. O haplótipo -108C/192R/311S, envolvendo os genes da PON1 e PON2, estava associado ao risco aumentado de retinopatia e nefropatia diabéticas.

(7) Não foram detectadas quaisquer evidências de associação entre os polimorfismos nos genes da eNOS e da CAT e a ocorrência das complicações vasculares do DM, tanto em caucasóides quanto em negróides.

(8) Os alelos -106T (AR) e 894T (eNOS) foram associados à presença de DM2, em caucasóides e negróides, respectivamente.

(9) Nove dos 11 polimorfismos analisados na presente tese apresentam uma variabilidade marcante na distribuição gênica, genotípica e haplotípica, entre caucasóides e negróides.

Assim, as perspectivas do presente estudo podem ser resumidas em cinco pontos fundamentais:

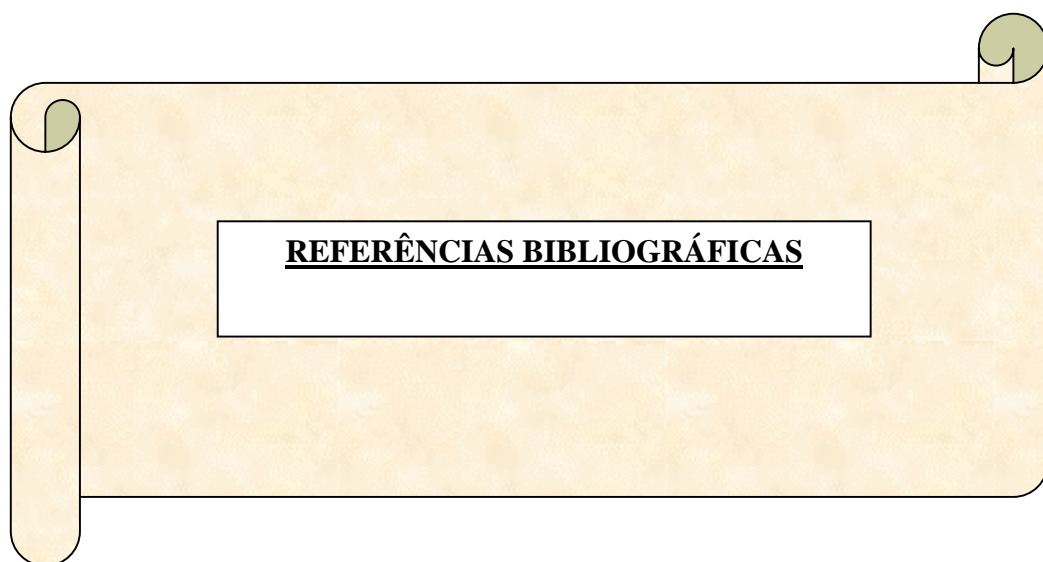
(1) Os polimorfismos relacionados à disfunção endotelial e ao estresse oxidativo embora constituam um campo de pesquisa promissor na identificação de variantes genéticas associadas às complicações crônicas do DM, têm sido até o momento pouco explorados, o que justifica uma maior ênfase nesta linha de investigação.

(2) Devido ao grande número de SNPs identificados e caracterizados e à variabilidade intra-genômica e inter-populacional no padrão de desequilíbrio de ligação, os estudos de associação deveriam focar na investigação de haplótipos, e não em alguns SNPs isoladamente.

(3) Como existe uma grande variabilidade genética entre os diversos grupos étnicos, a identificação de variantes genéticas associadas às complicações vasculares do DM requer que os estudos de associação investiguem populações etnicamente diferenciadas, especialmente no Brasil.

(4) A identificação dos subgrupos de pacientes que são mais propensos ao desenvolvimento das complicações crônicas do DM pode auxiliar no diagnóstico mais precoce e na prevenção dessas angiopatias, por meio da intervenção nos fatores de risco ambientais/comportamentais, especialmente nos indivíduos que apresentam fatores de risco genéticos adicionais.

(5) Devido ao grande número de comparações realizadas e ao limitado tamanho amostral, quando comparado com outros estudos realizados por consórcios internacionais, os nossos resultados devem ser confirmados em outras populações com o mesmo “background” genético.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamis AP (2002) Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? *Br J Ophthalmol* 86:363-365.
- Agardh E e Agardh CD (2004) Diabetic retinopathy. In: DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H e Zimmet P (eds) *International Textbook of Diabetes Mellitus*. 3ª ed. John Wiley & Sons, West Sussex, pp 1187-1206.
- Ahmed N (2005) Advanced glycation endproducts – role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 67:3-21.
- Aiello LP, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris III FL e Klein R (1998) Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 21:143-156.
- Allebrandt KV, Souza RL e Chautard-Freire-Maia EA (2002) Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro- and Afro-Brazilians. *Toxicol Appl Pharmacol* 180:151-156.
- American Diabetes Association (1998) Consensus development conference on the diagnosis of coronary heart disease in people with diabetes. *Diabetes Care* 21:1551-1559.
- American Diabetes Association (2004) Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 27:S79-S83.
- American Diabetes Association (2005) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 28:S37-S42.
- Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F e Grandsjean P (1997) Antioxidant enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 43:562-568.
- Arroyo JG (2002) Atherosclerotic cardiovascular disease and diabetic retinopathy: risk for the development and progression of retinopathy. *Br J Ophthalmol* 86:3-4.
- Asakimori Y, Yorioka N, Taniguchi Y, Ito T, Ogata S, Kyuden Y e Kohno N (2002) T(-786)→C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene influences the progression of renal disease. *Nephron* 91:747-751.
- Atli T, Keven K, Avci A, Kutlay S, Turkcapar N, Varli M, Aras S, Ertug E e Canbolat O (2004) Oxidative stress and antioxidant status in elderly diabetes mellitus and glucose intolerance patients. *Arch Gerontol Geriatr* 39:269-275.
- Aviram M e Rosenblat M (2004) Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Rad Biol Med* 37:1304-1316.

- Awata T, Neda T, Iizuka H, Kurihara S, Ohkubo T, Takata N, Osaki M, Watanabe M, Nakashima Y, Sawa T, Inukai K, Inoue I, Shibuya M, Mori K, Yoneya S e Katayama S (2004) Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic macular edema in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27:2184-2190.
- Aydin A, Orhan H, Sayal A, Özata M, Sahin G e Isimer A (2001) Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 34:65-70.
- Azumi H, Inoue N, Takeshita S, Rikitake Y, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H e Yokoyama M (1999) Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation* 100:1494-1498.
- Azumi H, Inoue N, Ohashi Y, Terashima M, Mori T, Fujita H, Awano K, Kobayashi K, Maeda K, Hata K, Shinke T, Kobayashi S, Hirata K, Kawashima S, Itabe H, Hayashi Y, Imajoh-Ohmi S, Itoh H e Yokoyama M (2002) Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1838-1844.
- Bandinelli E (2000) Variantes genéticas como fatores de risco para trombose venosa. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Barceló A e Rajpathak S (2001) Incidence and prevalence of diabetes mellitus in the Americas. *Pan Am J Public Health* 10:300-308.
- Bayraktutan U, Blayney L e Shah AM (2000) Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1903-1911.
- Bayraktutan U (2002) Free radicals, diabetes and endothelial dysfunction. *Diabetes Obes Metab* 4:224-238.
- Beck MO, Silveiro SP, Friedman R, Clausell N e Gross JL (1999) Asymptomatic coronary artery disease is associated with cardiac autonomic neuropathy and diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 22:1745-1747.
- Beck-Nielsen H e Groop LC (1994) Metabolic and genetic characterization of prediabetic states: sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 94:1714-1721.
- Bengtsson SHM, Gulluyan LM, Dusting GJ e Drummond GR (2003) Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30:849-854.
- Bhatia S, Shukla R, Venkata Madhu S, Kaur Gambhir J e Madhava Prabhu K (2003) Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clin Biochem* 36:557-562.

- Bo S, Ciccone G, Rosato R, Gancia R, Grassi G, Merletti F e Pagano GF (2005) Renal damage in patients with type 2 diabetes: a strong predictor of mortality. *Diabet Med* 22:258-265.
- Boemi M, Sirolla C, Testa R, Cenerelli S, Fumelli P e James RW (2004) Smoking is associated with reduced serum levels of the antioxidant enzyme, paraoxonase, in type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 21:423-427.
- Bonato D, Rosa RM, Saffi J e Henriques JAP (2004) Estresse oxidativo e envelhecimento. In: Henriques JAP e Salvador M (orgs) *Radicaís Livres e a Resposta Celular ao Estresse Oxidativo*. 1ª ed. ULBRA, Canoas, pp 185-200.
- Bozza A, Velloso APR, Atié J e Halfoun VLRC (2004) Macroangiopatia. In: Oliveira JEP e Milech A (eds) *Diabetes Mellitus: Clínica, Diagnóstico, Tratamento Multidisciplinar*. 1ª ed. Atheneu, São Paulo, pp 125-141.
- Brophy VH, Jamps RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP e Furlong CE (2001) Effects of 5' regulatory-region on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet* 68:1428-1436.
- Brown MR, Miller FJ Jr, Li WG, Ellingson AN, Mozena JD, Chatterjee P, Engelhardt JF, Zwacka RM, Oberley LW, Fang X, Spector AA e Weintraub NL (1999) Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 85:524-533.
- Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820.
- Bruno RM e Gross JL (2000) Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6-year follow-up study. *J Diabetes Complicat* 14:266-271.
- Cahilly C, Ballantyne CM, Lim DS, Gotto A e Marian AJ (2000) A variant of p22phox, involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Circ Res* 86:391-395.
- Cai H, Wang X, Colagiuri S e Wilcken DEL (1998) A common Glu298→Asp (894G→T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and vascular complications in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 21:2195-2196.
- Cai H, Duarte N, Wilcken DEL e Wang XL (1999) NADH/NADPH oxidase p22phox C242T polymorphism and coronary artery disease in the Australian population. *Eur J Clin Invest* 29:744-748.
- Cai H e Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87:840-844.
- Campo S, Sardo MA, Trimarchi G, Bonaiuto M, Fontana L, Castaldo M, Bonaiuto A, Saitta C, Bitto A, Manduca B, Riggio S e Saitta A (2004) Association between serum

paraoxonase (PON1) gene promoter T(-107)C polymorphism, PON1 activity and HDL levels in healthy Sicilian octogenarians. *Exp Gerontol* 39:1089-1094.

Canani LH, Gerchman F e Gross JL (1999) Familial clustering of diabetic nephropathy in Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes* 48:909-913.

Cao H, Girard-Globa A, Serusclat A, Bernard S, Bondon P, Picard S, Berthezene F e Moulin P (1998) Lack of association between carotid intima-media thickness and paraoxonase gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 138:361-366.

Cardon LR e Bell JI (2001) Association study designs for complex diseases. *Nature Rev Genet* 2:91-99.

Casas JP, Bautista LE, Humphries SE e Hingorani AD (2004) Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 109:1359-1365.

Channon KM e Guzik TJ (2002) Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol* 53:515-524.

Chavakis T, Bierhaus A e Nawroth PP (2004) RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infect* 6:1219-1225.

Chen K, Thomas SR e Keaney Jr. JF (2003) Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. *Free Rad Biol Med* 35:117-132.

Chistiakov DA, Savost' anov KV, Turakulov RI, Titovich EV, Zilbern LI, Kuraeva TL, Dedov II e Nosikov VV (2004) A new type 1 diabetes susceptibility locus containing the catalase gene (chromosome 11p13) in a Russian population. *Diabetes Metab Res Rev* 20:219-224.

Chowdhury TA, Dyer PH, Kumar S, Barnett AH e Bain SC (1999) Genetic determinants of diabetic nephropathy. *Clin Sci* 96:221-230.

Christiansen L, Bathum L, Frederiksen H e Christensen K (2004a) Paraoxonase 1 polymorphisms and survival. *Eur J Hum Genet* 12:843-847.

Christiansen L, Petersen HC, Bathum L, Frederiksen H, McGue M e Christensen K (2004b) The catalase -262C/T promoter polymorphism and aging phenotypes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59:B886-889.

Chung SSM, Ho ECM, Lam KSL e Chung SK (2003) Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 14:S233-S236.

- Ciulla TA, Amador AG e Zinman B (2003) Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies. *Diabetes Care* 26:2653-2664.
- Connolly SB, Sadlier D, Kieran NE, Doran P e Brady HR (2003) Transcriptome profiling and the pathogenesis of diabetic complications. *J Am Soc Nephrol* 14:S279-S283.
- Costa LA, Canani LH, Lisbôa HRK, Tres GS e Gross JL (2004) Aggregation of features of the metabolic syndrome is associated with increased prevalence of chronic complications in type 2 diabetes. *Diabet Med* 21:252-255.
- Costa LG, Cole TB, Jarvik GP e Furlong CE (2003) Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu Rev Med* 54:371-392.
- Dagher Z, Park YS, Asnaghi V, Hoehn T, Gerhardinger C e Lorenzi M (2004) Studies of rat and human retinas predict a role for the polyol pathway in human diabetic retinopathy. *Diabetes* 53:2404-2411.
- Dantas AM (2004) Retinopatia diabética. In: Oliveira JEP e Milech A (eds) *Diabetes Mellitus: Clínica, Diagnóstico, Tratamento Multidisciplinar*. 1ª ed. Atheneu, São Paulo, pp 143-166.
- Deakin S, Leviev I, Brulhart-Meynet MC e James RW (2003) Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position – 107, implicating the Sp1 transcription factor. *Biochem J* 372:643-649.
- DeFronzo RA (2004) Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 88:787-835.
- De Vriese AS, Verbeuren TJ, de Voorde JV, Lameire NH e Vanhoutte PM (2000) Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 130:963-974.
- den Enden MKV, Nyengaard JR, Ostrow E, Burgan JH e Williamson JR (1995) Elevated glucose levels increase retinal glycolysis and sorbitol pathway metabolism: implications for diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:1675-1685.
- Diamond J (2003) The double puzzle of diabetes. *Nature* 423:599-602.
- Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GAP, Curnutte JT e Orkin SH (1990) Human neutrophil cytochrome b light chain (p22phox): gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 86:1729-1737.
- Draganov DI e La Du BN (2004) Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369:78-88.

- Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- Ellis EA, Grant MB, Murray FT, Wachowski MB, Guberski DL, Kubilis PS e Luty GA (1998) Increased NADH oxidase activity in the retina of the BBZ/WOR diabetic rat. *Free Rad Biol Med* 24:111-120.
- Endemann DH e Schiffrin EL (2004) Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 15:1983-1992.
- Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J, Sumimoto H e Nawata H (2003) Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventive insulin treatment. *Diabetologia* 46:1428-1437.
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA e Grodsky GM (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:599-622.
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) (2001) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285:2486-2497.
- Fairchild TA, Fulton D, Fontana JT, Gratton JP, McCabe TJ e Sessa WC (2001) Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)→Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 276:26674-26679.
- Falcone C, Campo I, Emanuele E, Buzzi MP, Zorzetto M, Sbarsi I e Cuccia M (2004) Relationship between the -374T/A RAGE gene polymorphism and angiographic coronary artery disease. *Int J Mol Med* 14:1061-1064.
- Fang YZ, Yang S e Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18:872-879.
- Florez JC, Hirschhorn J e Altshuler D (2003) The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 4:257-291.
- Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris III FL e Klein R, for the American Diabetes Association (2003) Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 26:S99-S102.
- Forsberg L, de Faire U e Morgenstern R (2001a) Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch Biochem Biophys* 389:84-93.
- Forsberg L, Lyrenäs L, de Faire U e Morgenstern R (2001b) A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene

influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Rad Biol Med* 30:500-505.

Förstermann U, Boissel JP e Kleinert H (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 12:773-790.

Franco L (2004) Um problema de saúde pública – epidemiologia. In: Oliveira JEP e Milech A (eds) *Diabetes Mellitus: Clínica, Diagnóstico, Tratamento Multidisciplinar*. 1ª ed. Atheneu, São Paulo, pp. 19-32.

Freedman BI, Yu H, Anderson PJ, Roh BH, Rich SS e Bowden DW (2000) Genetic analysis of nitric oxide and endothelin in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 15:1794-1800.

Fukui T, Yoshiyama M, Hanatani A, Omura T, Yoshikawa J e Abe Y (2001) Expression of p22-phox and gp91-phox, essential components of NADPH oxidase, increases after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 281:1200-1206.

Gabbay KH (1973) The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *New Engl J Med* 288:831-836.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ e Altshuler D (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296:2225-2229.

Gardemann A, Mages P, Katz N, Tillmanns H e Haberbosch W (1999) The p22phox A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. *Atherosclerosis* 145:315-323.

Glauser TA, Titanic-Schefft M e Pippenger CE (1999) Racial differences in free radical scavenging enzyme activity in children. *J Child Neurol* 14:382-387.

Golser R, Gorren AC, Mayer B e Schmidt K (2003) Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system. *Nitric Oxide* 8:7-14.

Gosek K, Moczulski D, Zukowska-Szczechowska E e Grzeszczak W (2005) C-106T polymorphism in promoter of aldose reductase gene is a risk factor for diabetic nephropathy in type 2 diabetes patients with poor glycaemic control. *Nephron Exp Nephrol* 99:e63-e67.

Góth L e Eaton JW (2000) Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet* 356:1820-1821.

Goulas A, Fidani L, Kotsis A, Mirtsou V, Petersen RC, Tangalos E e Hardy J (2002) An association study of a functional catalase gene polymorphism, -262C→T, and patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 330:210-212.

- Gouvêa WL (2004) Nefropatia diabética. In: Oliveira JEP e Milech A (eds) Diabetes Mellitus: Clínica, Diagnóstico, Tratamento Multidisciplinar. 1ª ed. Atheneu, São Paulo, pp 167-181.
- Graham A, Heath P, Morten JEN e Markham AF (1991a) The human aldose reductase gene maps to chromosome 7q35. *Hum Genet* 86:509-514.
- Graham A, Brown L, Hedge PJ, Gammack AJ e Markham AF (1991b) Structure of the human aldose reductase gene. *J Biol Chem* 266:6872-6877.
- Grant PJ (2003) The genetics of atherothrombotic disorders: a clinician's view. *J Thromb Haemost* 1:1381-1390.
- Gray RP e Yudkin JS (2004) Clinical features and treatment of coronary heart disease in diabetes. In: DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H e Zimmet P (eds) International Textbook of Diabetes Mellitus. 3ª ed. John Wiley & Sons, West Sussex, pp 1449-1471.
- Griendling KK e Harrison DG (1999) Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. *Circ Res* 85:562-563.
- Griendling KK, Sorescu D e Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494-501.
- Gross JL, Zelmanovitz T, Oliveira J e Azevedo MJ (1999) Screening for diabetic nephropathy: is measurement of urinary albumin-to-creatinine ratio worthwhile? *Diabetes Care* 22:1599-1600.
- Gross JL, Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML e Zelmanovitz T (2005) Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care* 28:176-188.
- Guzik TJ, West NEJ, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R e Channon KM (2000a) Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 86:e85-e90.
- Guzik TJ, West NEJ, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R e Channon KM (2000b) Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation* 102:1744-1747.
- Halliwell B e Gutteridge JMC (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. 3ª edição. Oxford University Press, Oxford, 936 pp.
- Hasegawa G, Obayashi H, Kitamura A, Hashimoto M, Shigeta H, Nakamura N, Kondo M e Nishimura CY (1999) Increased levels of aldose reductase in peripheral mononuclear cells from type 2 diabetic patients with microangiopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 45:9-14.

- Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Sakamoto K, Ohtoshi K, Katakami N, Kawamori D, Miyatsuka T, Hatazaki M, Hazama Y e Hori M (2003) Association of NAD(P)H oxidase p22phox gene variation with advanced carotid atherosclerosis in Japanese type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26:458-463.
- He Z e King GL (2004) Microvascular complications of diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 33:215-238.
- Hingorani AD (2000) Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis. *Atherosclerosis* 154:521-527.
- Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U e Munzel T (2001) Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 88:e14-e22.
- Ho HT, Chung SK, Law JW, Ko BC, Tam SC, Brooks HL, Knepper MA e Chung SS (2000) Aldose reductase-deficient mice develop nephrogenic diabetes insipidus. *Mol Cell Biol* 20:5840-5846.
- Hodgkinson AD, Millward BA e Demaine AG (2002) Paraoxonase 2 polymorphisms are associated with diabetic nephropathy in Type II diabetes – To: Pinizzotto M, Castillo E, Fiaux M, Temier E, Gaillard RC e Ruiz J. *Diabetologia* 45:933-935.
- Hodgkinson AD, Millward BA e Demaine AG (2003) Association of the p22phox component of NAD(P)H oxidase with susceptibility to diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 26:3111-3115.
- Hu YM, Tian HM e Liu R (2003) Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase 1 is associated with carotid intima-media thickness in patients of type 2 diabetes mellitus of Chinese. *Diabetes Res Clin Pract* 61:21-27.
- Hudson BI, Stickland MH e Grant PJ (1998) Identification of polymorphisms in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene: prevalence in type 2 diabetes and ethnic groups. *Diabetes* 47:1155-1157.
- Hudson BI, Stickland MH, Futers TS e Grant PJ (2001a) Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes* 50:1505-1511.
- Hudson BI, Stickland MH, Futers TS e Grant PJ (2001b) Study of the –429 T/C and – 374 T/A receptor for advanced glycation end products promoter polymorphisms in diabetic and nondiabetic subjects with macrovascular disease. *Diabetes Care* 24:2004.
- Hudson BI, Stickland MH, Grant PJ e Futers TS (2001c) Characterization of allelic and nucleotide variation between the RAGE gene on chromosome 6 and a homologous

pseudogene sequence to its 5' regulatory region on chromosome 3: implications for polymorphic studies in diabetes. *Diabetes* 50:2646-2651.

Hudson BI e Schmidt AM (2004) RAGE: a novel target for drug intervention in diabetic vascular disease. *Pharm Res* 21:1079-1086.

Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, Nakauchi Y, Morita T, Arii K, Hiroyuki I, Kumon Y e Hashimoto K (1998) Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 47:598-602.

Ikeda Y, Suehiro T, Ohsaki F, Arii K, Kumon Y e Hashimoto K (2003) Relationships between polymorphisms of the human serum paraoxonase gene and insulin sensitivity in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 60:79-85.

Imperatore G, Hanson RL, Pettitt DJ, Kobes S, Bennett PH e Knowler WC (1998) Sib-pair linkage analysis for susceptibility genes for microvascular complications among Pima Indians with type 2 diabetes: Pima Diabetes Genes Group. *Diabetes* 47:821-830.

Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K, Yamada S, Akita H e Yokoyama M (1998) Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22phox gene in patients with coronary artery disease. *Circulation* 97:135-137.

Inoue M, Suehiro T, Nakamura T, Ikeda Y, Kumon Y e Hashimoto K (2000) Serum arylesterase/diazoxonase activity and genetic polymorphisms in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 49:1400-1405.

James RW, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Froguel P e Blatter-Garin MC (2000) Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49:1390-1393.

Janel N, Robert K, Chabert C, Ledru A, Gouédard C, Barouki R, Delabar JM e Chassé JF (2004) Mouse liver paraoxonase-I gene expression is downregulated in hyperhomocysteinemia. *Thromb Haemost* 92:221-222.

Jarvik GP, Hatsukami TS, Carlson C, Richter RJ, Jampsa R, Brophy VH, Margolin S, Rieder M, Nickerson D, Schellenberg GD, Heagerty PJ e Furlong CE (2003) Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1465-1471.

JiXiong X, BiLin X, MingGong Y e ShuQin L (2003) -429T/C and -374 T/A polymorphisms of RAGE gene promoter are not associated with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26:2696-2697.

Jones RD, Hancock JT e Morice AH (2000) NADPH oxidase: an universal oxygen sensor? *Free Rad Biol Med* 29:416-424.

- Jones SC, Marshall SM e Bilous RW (2004) Diabetic nephropathy. In: DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H e Zimmet P (eds) *International Textbook of Diabetes Mellitus*. 3ª ed. John Wiley & Sons, West Sussex, pp 1219-1251.
- Joussen AM, Poulaki V, Le ML, Koizumi K, Esser C, Janicki H, Schraermeyer U, Kociok N, Fauser S, Kirchhof B, Kern TS e Adamis AP (2004) A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J* 18:1450-1452.
- Junqueira VBC, Barros SBM, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL e Deucher GP (2004) Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med* 25:5-16.
- Kao YL, Donaghue K, Chan A, Knight J e Silink M (1999) A novel polymorphism in the aldose reductase gene promoter region is strongly associated with diabetic retinopathy in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes* 48:1338-1340.
- Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Blaszczyk J e Pawlak W (1998) Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 13:2829-2832.
- Kesavulu MM, Rao BK, Giri R, Vijaya J, Subramanyam G e Apparao Ch (2001) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diabetes Res Clin Pract* 53:33-39.
- Kittles RA e Weiss KM (2003) Race, ancestry, and genes: implications for defining disease risk. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 4:33-67.
- Knowler WC, Coresh J, Elston RC, Freedman BI, Iyengar SK, Kimmel PL, Olson JM, Plaetke R, Sedor JR e Seldin MF; On behalf of the Family Investigation of Nephropathy and Diabetes Research Group (2005) The Family Investigation of Nephropathy and Diabetes (FIND): design and methods. *J Diabetes Complications* 19:1-9.
- Kobayashi S, Inoue N, Azumi H, Seno T, Hirata K, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Yokozaki H e Yokoyama M (2002) Expressional changes of the vascular antioxidant system in atherosclerotic coronary arteries. *J Atheroscler Thromb* 9:184-190.
- Koda Y, Tachida H, Soejima M, Takenaka O e Kimura H (2004) Population differences in DNA sequence variation and linkage disequilibrium at the PON1 gene. *Ann Hum Genet* 68:110-119.
- Kone BC (1997) Nitric oxide in renal health and disease. *Am J Kidney Dis* 30:311-333.
- Kunsch C e Medford RM (1999) Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 85:753-766.
- Lawlor DA, Day INM, Gaunt TR, Hinks LJ, Briggs PJ, Kiessling M, Timpson N, Smith GD e Ebrahim S (2004) The association of the PON1 Q192R polymorphism with

coronary heart disease: findings from the British Women's Heart and Health cohort study and a meta-analysis. *BMC Genetics* 5:17.

- Letellier C, Durou MR, Jouanolle AM, Le Gall JY, Poirier JY e Ruelland A (2002) Serum paraoxonase activity and paraoxonase gene polymorphism in type 2 diabetic patients with or without vascular complications. *Diabetes Metab* 28:297-304.
- Leus FR, Zwart M, Kastelein JJP e Voorbij HAM (2001) PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis* 154:641-649.
- Leviev I e James RW (2000) Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:516-521.
- Leviev I, Kalix B, Brulhart-Meynet MC e James RW (2001a) The paraoxonase PON1 promoter polymorphism C(-107)T is associated with increased serum glucose concentrations in non-diabetic patients. *Diabetologia* 44:1177-1183.
- Leviev I, Righetti A e James RW (2001b) Paraoxonase promoter polymorphism T(-107)C and relative paraoxonase deficiency as determinants of risk of coronary artery disease. *J Mol Med* 79:457-463.
- Li H, Wallerah T e Förstermann U (2002a) Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 7:132-147.
- Li H, Wallerah T, Münzel T e Förstermann U (2002b) Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs. *Nitric Oxide* 7:149-164.
- Li HL, Liu DP e Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases (2003) *J Mol Med* 81:766-779.
- Li JM e Shah AM (2003) ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14:S221-S226.
- Li JM e Shah AM (2004) Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R1014-R1030.
- Li Q, Xie P, Huang J, Gu Y, Zeng W e Song H (2002) Polymorphisms and functions of the aldose reductase gene 5' regulatory region in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Chin Med J* 115:209-213.
- Lindner TH, Monks D, Wanner C e Berger M (2003) Genetic aspects of diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 84:S186-S191.
- Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES e Hirschhorn JN (2003) Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to

- susceptibility to common disease. *Nat Genet* 33:177-182.
- Loscalzo J (2003) Oxidant stress: a key determinant of atherothrombosis. *Biochem Soc Trans* 31:1059-1061.
- Lusis AJ, Mar R e Pajukanta P (2004) Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5:189-218.
- Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJM e Mackness MI (2000) Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci* 98:355-363.
- Makiishi T, Araki S, Koya D, Maeda S, Kashiwagi A e Haneda M (2003) C-106T polymorphism of AKR1B1 is associated with diabetic nephropathy and erythrocyte aldose reductase content in Japanese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 42:943-951.
- Masharani U, Karam JH e German MS (2004) Pancreatic Hormones & Diabetes Mellitus. In: Greenspan FS e Gardner DG (eds) *Basic & Clinical Endocrinology*. 7^a ed. McGraw-Hill Companies, New York, pp 658-746.
- Mata-Balaguer T, de la Herrán R, Ruiz-Rejón C, Ruiz-Rejón M, Garrido-Ramos MA e Ruiz-Rejón F (2004) Angiotensin-converting enzyme and p22phox polymorphisms and the risk of coronary heart disease in a low-risk Spanish population. *Int J Cardiol* 95:145-151.
- Matés JM e Sánchez-Jiménez F (1999) Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 4:339-345.
- Matsunaga-Irie S, Maruyama T, Yamamoto Y, Motohashi Y, Hirose H, Shimada A, Murata M e Saruta T (2004) Relation between development of nephropathy and the p22phox C242T and receptor for advanced glycation end product G1704T gene polymorphisms in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 27:303-307.
- Maxwell AJ (2002) Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. *Nitric Oxide* 6:101-124.
- McDonald DM, Alp NJ e Channon KM (2004) Functional comparison of the endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp polymorphic variants in human endothelial cells. *Pharmacogenetics* 14:831-839.
- Melidonis A, Kyriazis IA, Georgopali A, Zairis M, Lyras A, Lambropoulos T, Matsaidonis D e Foussas S (2003) Prognostic value of the carotid artery intima-media thickness for the presence and severity of coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 26:3189-3190.
- Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, Harada M, Kajiyama N, Kishimoto I, Kuwahara K, Hino J, Ogawa E, Hamanaka I, Kamitani S, Takahashi N, Kawakami R, Kangawa K, Yasue H e Nakao K (2000) Replication

protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T→C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet* 9:2629-2637.

Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ, Tsui LC e Prochazka M (1998) Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene* 213:149-157.

Monti LD, Barlassina C, Citterio L, Galluccio E, Berzuini C, Setola E, Valsecchi G, Lucotti P, Pozza G, Bernardinelli L, Casari G e Piatti P (2003) Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 52:1270-1275.

Moreno PR, Murcia AM, Palacios IF, Leon MN, Bernardi VH, Fuster V e Fallon JT (2000) Coronary composition and macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus. *Circulation* 102:2180-2184.

Morton NE e Collins A (1998) Tests and estimates of allelic association in complex inheritance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11389-11393.

Muchová J, Liptáková A, Országhová Z, Garaiová I, Tisoň P, Cársky J e Duracková Z (1999) Antioxidant systems in polymorphonuclear leucocytes of type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 16:74-78.

Murata M, Maruyama T, Suzuki Y, Saruta T e Ikeda Y (2004) Paraoxonase 1 ¹⁹²Gln/Arg polymorphism is associated with the risk of microangiopathy in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 21:837-844.

Nagase S, Suzuki H, Wang Y, Kikuchi S, Hirayama A, Ueda A, Takada K, Oteki T, Obara M, Aoyagi K e Koyama A (2003) Association of eNOS gene polymorphisms with end stage renal diseases. *Mol Cell Biochem* 244:113-118.

Naka Y, Bucciarelli LG, Wendt T, Lee LK, Rong LL, Ramasamy R, Yan SF e Schmidt AM (2004) RAGE axis: animal models and novel insights into the vascular complications of diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1342-1349.

Nakamura N, Obayashi H, Fujii M, Fukui M, Yoshimori K, Ogata M, Hasegawa G, Shigeta H, Kitagawa Y, Yoshikawa T, Kondo M, Ohta M, Nishimura M, Nishinaka T e Nishimura CY (2000) Induction of aldose reductase in cultured human microvascular endothelial cells by advanced glycation end products. *Free Rad Biol Med* 29:17-25.

Nakano T, Matsunaga S, Nagata A e Maruyama T (2003) NAD(P)H oxidase p22phox gene C242T polymorphism and lipoprotein oxidation. *Clin Chim Acta* 335:101-107.

Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y e Nakao K (1999) T-786→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 99:2864-2870.

- Nascimento OJM (2004) Neuropatia diabética: diagnóstico e tratamento. In: Oliveira JEP e Milech A (eds) Diabetes Mellitus: Clínica, Diagnóstico, Tratamento Multidisciplinar. 1ª ed. Atheneu, São Paulo, pp 183-197.
- Neamat-Allah M, Feeney SA, Savage DA, Maxwell AP, Hanson RL, Knowler WC, El Nahas AM, Plater ME, Shaw J, Boulton AJM, Duff GW e Cox A (2001) Analysis of the association between diabetic nephropathy and polymorphisms in the aldose reductase gene in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 18:906-914.
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D e Shaw A (1992) Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267:14998-15004.
- Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM e Reddy ST (2001) Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 276:44444-44449.
- Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M e Reddy ST (2005) The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 38:153-163.
- Nishimura C, Hotta Y, Gui T, Seko A, Fujimaki T, Ishikawa T, Hayakawa M, Kanai A e Saito T (1997) The level of erythrocyte aldose reductase is associated with the severity of diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 37:173-177.
- Noiri E, Satoh H, Taguchi J, Brodsky SV, Nakao A, Ogawa Y, Nishijima S, Yokomizo T, Tokunaga K e Fujita T (2002) Association of eNOS Glu298Asp polymorphism with end-stage renal disease. *Hypertension* 40:535-540.
- Notkins AL (2002) Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *J Biol Chem* 277:43545-43548.
- Oliveira JEP (2004) Conceito, classificação e diagnóstico do diabetes mellitus. In: Oliveira JEP e Milech A (eds) Diabetes Mellitus: Clínica, Diagnóstico, Tratamento Multidisciplinar. 1ª ed. Atheneu, São Paulo, pp 7-18.
- Ogata M (1991) Acatlasemia. *Hum Genet* 86:331-340.
- Ohtoshi K, Yamasaki Y, Gorogawa S, Hayaishi-Okano R, Node K, Matsuhisa M, Kajimoto Y e Hori M (2002) Association of -786T-C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene with insulin resistance. *Diabetologia* 45:1594-1601.
- Okrainec K, Banerjee DK e Eisenberg MJ (2004) Coronary artery disease in the developing world. *Am Heart J* 148:7-15.
- O'Rahilly S, Barroso I e Wareham NJ (2005) Genetic factors in type 2 diabetes: the end of the beginning? *Science* 307:370-373.

- Otel I, Ledru F e Danchin N (2003) Ischemic heart disease in type 2 diabetes. *Metabolism* 52:6-12.
- Palatnik M, Silva Jr. WA, Estalote AC, Oliveira JEP, Milech A e Zago MA (2002) Ethnicity and type 2 diabetes in Rio de Janeiro, Brazil, with a review of the prevalence of the disease in Amerindians. *Hum Biol* 74:533-544.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM e Pena SD (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:177-182.
- Petrash JM (2004) All in the family: aldose reductase and closely related aldo-keto reductases. *Cell Mol Life Sci* 61:737-749.
- Petrovic MG, Steblovnik K, Peterlin B e Petrovic D (2003) The -429 T/C and - 374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene are not risk factors for diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 220:873-876.
- Pettersson-Fernholm K, Forsblom C, Hudson BI, Perola M, Grant PJ e Groop PH, for the Finn-Diane Study Group (2003) The functional -374 T/A RAGE gene polymorphism is associated with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 52:891-894.
- Pinizzotto M, Castillo E, Fiaux M, Temler E, Gaillard RC e Ruiz J (2001) Paraoxonase 2 polymorphisms are associated with nephropathy in type II diabetes. *Diabetologia* 44:104-107.
- Poirier O, Nicaud V, Vionnet N, Raoux S, Tarnow L, Vlassara H, Parving HH e Cambien F (2001) Polymorphism screening of four genes encoding advanced glycation end-product putative receptors: association study with nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 50:1214-1218.
- Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J e La Du BN (1996) The human serum paraoxonase arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 33:498-507.
- Pulkkinen A, Viitanen L, Kareinen A, Lehto S, Vauhkonen I e Laakso M (2000) Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. *J Mol Med* 78:372-379.
- Quan F, Korneluk R, Tropak M e Gravel R (1986) Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Res* 14:5321-5335.
- Raza JA e Movahed A (2003) Current concepts of cardiovascular diseases in diabetes mellitus. *Int J Cardiol* 89:123-134.

- Rea IM, McKeown PP, McMaster D, Young IS, Patterson C, Savage MJ, Belton C, Marchegiani F, Olivieri F, Bonafe M e Franceschi C (2004) Paraoxonase polymorphisms PON1 192 and 55 and longevity in Italian centenarians and Irish nonagenarians: a pooled analysis. *Exp Gerontol* 39:629-635.
- Reis AF e Velho G (2002) Bases genéticas do diabetes mellitus tipo 2. *Arq Bras Endocrinol Metab* 46:426-432.
- Rema M, Saravanan G, Deepa R e Mohan V (2002) Familial clustering of diabetic retinopathy in South Indian type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 19:910-916.
- Rippin JD, Patel A e Bain SC (2001) Genetics of diabetic nephropathy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15:345-358.
- Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A e Mackness MI (2001) Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 354:1-7.
- Rogus JJ, Warram JH e Krolewski AS (2002) Genetic studies of late diabetic complications: the overlooked importance of diabetes duration before complication onset. *Diabetes* 51:1655-1662.
- Rojas A e Morales MA (2004) Advanced glycation and endothelial functions: a link towards vascular complications in diabetes. *Life Sci* 76:715-730.
- Rudofsky Jr. G, Isermann B, Schilling T, Schiekofer S, Andrassy M, Schneider JG, Morcos M, Humpert PM, Sayed AA, Witte S, Renn W, Pfohl M, Hamann A, Nosikov V, Schleicher E, Haring HU, Rudofsky G, Ritz E, Nawroth PP e Bierhaus A (2004) A 63bp deletion in the promoter of RAGE correlates with a decreased risk for nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 112:135-141.
- Saha N, Sanghera DK e Kamboh MI (1999) The p22phox polymorphism C242T is not associated with CHD risk in Asian Indians and Chinese. *Eur J Clin Invest* 29:999-1002.
- Salles GF, Bloch KV e Cardoso CR (2004) Mortality and predictors of mortality in a cohort of Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 27:1299-1305.
- Sanghera DK, Aston CE, Saha N e Kamboh MI (1998) DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 62:36-44.
- Santos KG, Tschiedel B, Schneider J, Souto K e Roisenberg I (2003) Diabetic retinopathy in Euro-Brazilian type 2 diabetic patients: relationship with polymorphisms in the aldose reductase, the plasminogen activator inhibitor-1 and the methylenetetrahydrofolate reductase genes. *Diabetes Res Clin Pract* 61:133-136.

- Santos KG, Tschiedel B, Schneider JR, Souto KEP e Roisenberg I (2005) Prevalence of retinopathy in Caucasian type 2 diabetic patients from the South of Brazil and relationship with clinical and metabolic factors. *Braz J Med Biol Res* 38:221-225.
- Sato S, Secchi EF, Lizak MJ, Fukase S, Ohta N, Murata M, Tsai JY e Kador PF (1999) Polyol formation and NADPH-dependent reductases in dog retinal capillary pericytes and endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:697-704.
- Scacchi R, Corbo RM, Rickards O e de Stefano GF (2003) New data on the world distribution of paraoxonase (PON1 Gln 192→Arg) gene frequencies. *Hum Biol* 75:365-373.
- Scheffel RS, Bortolanza D, Weber CS, Costa LA, Canani LH, Santos KG, Crispim D, Roisenberg I, Lisboa HR, Tres GS, Tschiedel B e Gross JL (2004) Prevalência de complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes melito do tipo 2 em atendimento ambulatorial. *Rev Assoc Med Bras* 50:263-267.
- Schlueter C, Hauke S, Flohr AM, Rogalla P e Bullerdiek J (2003) Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms – a result of regulated alternative splicing? *Biochim Biophys Acta* 1630:1-6.
- Schmidt MI e Duncan BB (1999) Epidemiologia clínica e a medicina embasada em evidências. In: Rouquayrol MZ e Filho NA (eds) *Epidemiologia & Saúde*. 5ª ed. MEDSi, São Paulo, pp 183-206.
- Sen-Banerjee S, Siles X e Campos H (2000) Tobacco smoking modifies association between Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene and risk of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2120-2126.
- Senti M, Aubo C e Tomas M (2000) Differential effects of smoking on myocardial infarction risk according to the Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase gene. *Metabolism* 49:557-559.
- Senti M, Tomás M, Vila J, Marrugat J, Elosua R, Sala J e Masia R (2001) Relationship of age-related myocardial infarction risk and Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase gene: the REGICOR study. *Atherosclerosis* 156:443-449.
- Senti M, Tomás M, Fitó M, Weinbrenner T, Covas MI, Sala J, Masiá R e Marrugat J (2003) Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5422-5426.
- Shimizu H, Ohtani KI, Tsuchiya T, Sato N, Tanaka Y, Takahashi H, Uehara Y, Inukai T e Mori M (2000) Aldose reductase mRNA expression is associated with rapid development of diabetic microangiopathy in Japanese type 2 diabetic (T2DM) patients. *Diabetes Nutr Metab* 13:75-79.

- Shin YS, Baek SH, Chang KY, Park CW, Yang CW, Jin DC, Kim YS, Chang YS e Bang BK (2004) Relations between eNOS Glu298Asp polymorphism and progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 65:257-265.
- Shinozaki K, Ayajiki K, Kashiwagi A, Masada M e Okamura T (2004) Malfunction of vascular control in lifestyle-related diseases: mechanisms underlying endothelial dysfunction in the insulin-resistant state. *J Pharmacol Sci* 96:401-405.
- Siemianowicz K, Gminski J, Telega A, Wójcik A, Posielezna B, Grabowska-Bochenek R e Francuz T (2004) Blood antioxidant parameters in patients with diabetic retinopathy. *Int J Mol Med* 14:433-437.
- Siems WG, Sommerburg O e Grune T (2000) Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin Nephrol* 53:S9-S17.
- Simon D, Palatnik M e Roisenberg I (2002) Analysis of the -1185A/G von Willebrand factor (VWF) gene polymorphism in two Brazilian ethnic groups and its effect on the plasma VWF levels. *Thromb Res* 105:519-522.
- Simon D e Roisenberg I (2004) Type 2N von Willebrand disease mutations in Brazilian individuals. *Haemophilia* 10:473-476.
- Singh R, Barden A, Mori T e Beilin L (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44:129-146.
- Singleton JR, Smith AG, Russell JW e Feldman EL (2003) Microvascular complications of impaired glucose tolerance. *Diabetes* 52:2867-2873.
- Sivenius K, Niskanen L, Voutilainen-Kaunisto R, Laakso M e Uusitupa M (2004) Aldose reductase gene polymorphisms and susceptibility to microvascular complications in type 2 diabetes. *Diabet Med* 21:1325-1333.
- Skrha J (2003) Pathogenesis of angiopathy in diabetes. *Acta Diabetol* 40:S324-S329.
- Sobel BE (2002) Effects of glycemic control and other determinants on vascular disease in type 2 diabetes. *Am J Med* 113:12S-22S.
- Songer TJ e Barcelo A (2004) Economics of care: the Americas. In: DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H e Zimmet P (eds) *International Textbook of Diabetes Mellitus*. 3^a ed. John Wiley & Sons, West Sussex, pp 1843-1853.
- Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR e Griendling KK (2002) Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 105:1429-1435.

- Sözmen B, Delen Y, Girgin FK e Sözmen EY (1999) Catalase and paraoxonase in hypertensive type 2 diabetes mellitus: correlation with glycemic control. *Clin Biochem* 32:423-427.
- Stanger O, Renner W, Khoschorur G, Rigler B e Wascher TC (2001) NADH/NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and lipid peroxidation in coronary artery disease. *Clin Physiol* 21:718-722.
- Stehouwer CDA e Schalkwijk (2004) Endothelial function and dysfunction. In: DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H e Zimmet P (eds) *International Textbook of Diabetes Mellitus*. 3ª ed. John Wiley & Sons, West Sussex, pp 1409-1423.
- Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE, Jiang R, Messer CJ, Chew A, Han JH, Duan J, Carr JL, Lee MS, Koshy B, Kumar AM, Zhang G, Newell WR, Windemuth A, Xu C, Kalbfleisch TS, Shaner SL, Arnold K, Schulz V, Drysdale CM, Nandabalan K, Judson RS, Ruano G e Vovis GF (2001) Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science* 293:489-493.
- Stern DM, Yan SD, Yan SF e Schmidt AM (2002) Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing Res Rev* 1:1-15.
- Stitt AW (2003) The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Exp Mol Pathol* 75:95-108.
- Stocker R e Keaney Jr. JF (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 84:1381-1478.
- Strachan T e Read AP (1999) *Human Molecular Genetics*. 2ª edição. John Wiley & Sons, Oxford, 576 pp.
- Stratton IM, Kohner EM, Aldington SJ, Turner RC, Holman RR, Manley SE e Matthews DR (2001) UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia* 44:156-163.
- Strojek K (2003) Features of macrovascular complications in type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol* 40:S334-S337.
- Suehiro T, Nakamura T, Inoue M, Shiinoki T, Ikeda Y, Kumon Y, Shindo M, Tanaka H e Hashimoto K (2000) A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis* 150:295-298.
- Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, Inoko H e Ikemura T (1994) Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics* 23:408-419.

- Susztak K, Sharma K, Schiffer M, McCue P, Ciccone E e Bottinger EP (2003) Genomic strategies for diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14:S271-S278.
- Sutherland WH, Manning PJ, de Jong SA, Allum AR, Jones SD e Williams SM (2001) Hormone-replacement therapy increases serum paraoxonase arylesterase activity in diabetic postmenopausal women. *Metabolism* 50:319-324.
- Szklo M e Nieto FJ (1999) Arteriosclerose, infecção e doença cardiovascular. *Ciência Hoje* 26:25-29.
- Tanus-Santos JE, Desai M e Flockhart DA (2001) Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 11:719-725.
- Tarpey MM e Fridovich I (2001) Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res* 89:224-236.
- Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP e Moss J (2000) Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2832-2835.
- Tishkoff SA e Williams SM (2002) Genetic analysis of african populations: human evolution and complex disease. *Nature Rev Genet* 3:611-621.
- Tooke JE e Goh KL (1999) Vascular function in type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes: the case for intrinsic endotelopathy. *Diabet Med* 16:710-715.
- Tracy RP (2004) Atherogenesis and coronary artery disease. In: DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H e Zimmet P (eds) *International Textbook of Diabetes Mellitus*. 3^a ed. John Wiley & Sons, West Sussex, pp 1437-1447.
- Turk HM, Sevinc A, Camci C, Cigli A, Buyukberber S, Savli H e Bayraktar N (2002) Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 39:117-122.
- Ukkola O, Erkkilä PH, Savolainen MJ e Kesäniemi YA (2001) Lack of association between polymorphisms of catalase, copper-zinc superoxide dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Intern Med* 249:451-459.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group (1998) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352:837-853.
- Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N e Griendling KK (1996) 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* 271:23317-23321.

- van Dam RM (2003) The epidemiology of lifestyle and risk for type 2 diabetes. *Eur J Epidemiol* 18:1115-1125.
- van Leiden HA, Moll AC, Dekker JM, Abramoff MD e Polak BCP (2003) Photography or ophthalmoscopy for detection of diabetic retinopathy? *Diabetes Care* 26:1318-1319.
- Vinores SA, Ccampochiaro PA, Williams EH, May EE, Green WR e Sorenson RL (1988) Aldose reductase expression in human diabetic retina and retinal pigment epithelium. *Diabetes* 37:1658-1664.
- Vlassara H e Palace MR (2002) Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med* 251:87-101.
- Wackers FJ, Young LH, Inzucchi SE, Chyun DA, Davey JA, Barrett EJ, Taillefer R, Wittlin SD, Heller GV, Filipchuk N, Engel S, Ratner RE e Iskandrian AE, for the Detection of Ischemia in Asymptomatic Diabetics (DIAD) Investigators (2004) Detection of silent myocardial ischemia in asymptomatic diabetic subjects: the DIAD study. *Diabetes Care* 27:1954-1961.
- Wall JD e Pritchard JK (2003) Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet* 4:587-597.
- Wang XL e Wang J (2000) Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 70:241-251.
- Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B e Wang J (2000) Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett* 471:45-50.
- Wang J, Dudley D e Wang XL (2002) Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:e1-e4.
- Wang Y, Ng MC, Lee SC, So WY, Tong PC, Cockram CS, Critchley JAJH e Chan JCN (2003) Phenotypic heterogeneity and associations of two aldose reductase gene polymorphisms with nephropathy and retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26:2410-2415.
- Warpeha KM e Chakravarthy U (2003) Molecular genetics of microvascular disease in diabetic retinopathy. *Eye* 17:305-311.
- Wassmann S, Wassmann K e Nickenig G (2004) Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44:381-386.
- Wendt T, Tanji N, Guo J, Hudson BI, Bierhaus A, Ramasamy R, Arnold B, Nawroth PP, Yan SF, D'Agati V e Schmidt AM (2003) Glucose, glycation, and RAGE:

implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14:1383-1395.

West IC (2000) Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 17:171-180.

Wheatcroft SB, Williams IL, Shah AM e Kearney MT (2003) Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med* 20:255-268.

Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R e Danesh J (2004) Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet* 363:689-695.

Whitehead AS e FitzGerald GA (2001) Twenty-first century phox: not yet ready for widespread screening. *Circulation* 103:7-9.

Williams SM ET AL (2000) Combinations of variations in multiple genes are associated with hypertension. *Hypertension* 36:2-6.

Wolin MS (2000) Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1430-1442.

Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, Sone T, Tanaka M e Yokota M (2002) Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 347:1916-1923.

Yamada Y, Ichihara S, Izawa H, Tanaka M e Yokota M (2004) Genetic risk for coronary artery disease in individuals with or without type 2 diabetes. *Mol Genet Metab* 81:282-290.

Yamaoka T, Nishimura C, Yamashita K, Itakura M, Yamada T, Fujimoto J e Kokai Y (1995) Acute onset of diabetic pathological changes in transgenic mice with human aldose reductase cDNA. *Diabetologia* 38:255-261.

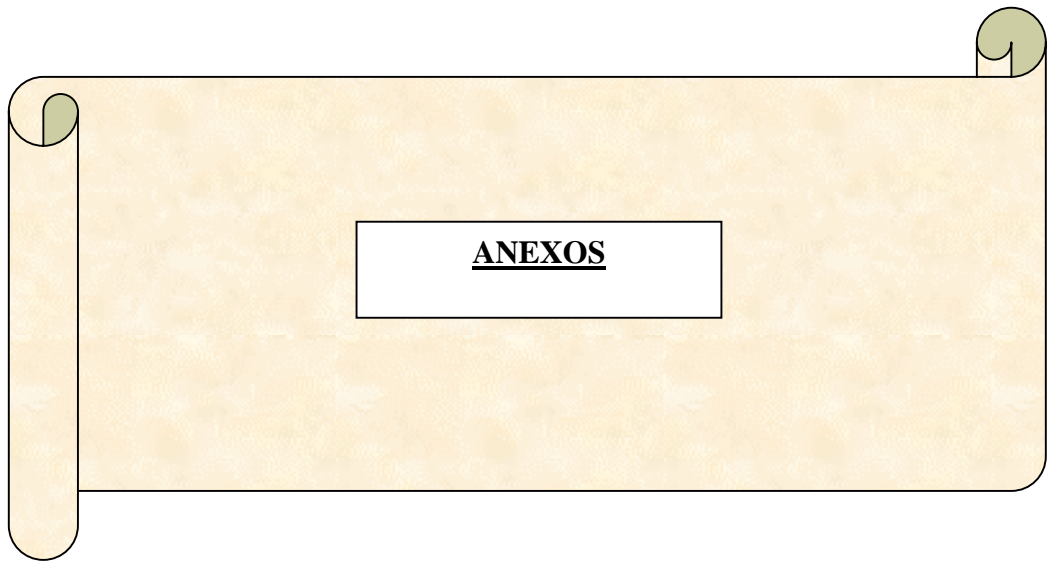
Yan SF, Ramasamy R, Naka Y e Schmidt AM (2003) Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res* 93:1159-1169.

Yang B, Millward A e Demaine A (2003) Functional differences between the susceptibility Z-2/C-106 and protective Z+2/T-106 promoter region polymorphisms of the aldose reductase gene may account for the association with diabetic microvascular complications. *Biochim Biophys Acta* 1639:1-7.

Yokoyama M, Inoue N e Kawashima S (2000) Role of the vascular NADH/NADPH oxidase system in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 902:241-247.

Yokoyama M (2004) Oxidant stress and atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 4:110-115.

- Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T e Yamamoto H (2003) Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* 370:1097-1109.
- Zhao H, Pfeiffer R e Gail MH (2003) Haplotype analysis in population genetics and association studies. *Pharmacogenomics* 4:171-178.
- Zondervan KT e Cardon LR (2004) The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet* 5:89-100.



ANEXO I - FICHA CLÍNICA DE AVALIAÇÃO DO PACIENTE DIABÉTICO

DM nº: _____ Hospital: _____ Prontuário: _____ Data: ___/___/___

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____
Fone 1: _____ Fone 2: _____ Sexo: <input type="checkbox"/> 1- masculino 2- feminino
Data de nascimento: ___/___/___ Idade: _____ Estado civil: _____
Endereço: _____
Bairro: _____ Cidade: _____
Estado: _____ CEP: _____ Entrevistador: _____

Grupo étnico (impressão do examinador): 1- caucasóide 2- negróide 3- outro

Entre as seguintes opções, como você se classifica em relação a cor da pele ?

1- branco 2- negro 3- mulato 4- oriental 5- índio 6- outros

Origem dos avós/bisavós (Europa, África, Ásia - se possível, especificar o país):

2. DADOS DE DIAGNÓSTICO

Qual sua idade quando descobriu o diabetes? _____ ou Data do diagnóstico: ___/___/___

Na ocasião do diagnóstico do DM, você foi internado? 1-sim 2-não

Motivo: _____

Qual o seu tratamento para o DM?

- | | | |
|------------------|-------------------------------|----------------------|
| 1- apenas dieta | 5- sulfoniluréia + metformina | 8- insulina |
| 2- sulfoniluréia | 6- sulfoniluréia + outros | 9- agente + insulina |
| 3- metformina | 7- metformina + agente oral | 10- outros |
| 4- glitazonas | | |

Se insulina, quanto tempo após o diagnóstico do DM? _____ anos _____ meses

Diagnóstico ou impressão do examinador: Tipo de DM

1- DM tipo 1 2- DM tipo 2 3- DMG 9 - Não classificável

Outros medicamentos (quais e tempo de uso): _____

Sr(a) fuma atualmente? 1- sim 2- não

Se **sim**, quantos cigarros por dia? _____

Com que idade começou a fumar? _____ anos

Tipo de fumo: 1- cigarro 2- charuto 3- cachimbo

Se não fuma, o Sr.(a) já fumou? (fumo passado) 1- sim 2- não

Se **sim**, quantos cigarros por dia? _____

Com que idade começou a fumar? _____ anos

Há quanto tempo parou de fumar? _____ anos _____ meses

Tipo de fumo: 1- cigarro 2- charuto 3- cachimbo

FUMO: 1- Nunca fumou 2- Ex-fumante 3- Fumante

Faz uso de bebidas alcoólicas? 1- sim 2- não

Em caso positivo, qual a frequência, a quantidade e o tipo de bebida (por semana)?

Se **Sim**, responda às perguntas abaixo (questionário CAGE):

1- Alguma vez você já sentiu que deveria parar de beber? 1- sim 2- não

2- Alguma vez as pessoas o incomodaram criticando seu jeito de beber? 1- sim 2- não

3- Alguma vez você se sentiu mal (ou culpado) a respeito da bebida? 1- sim 2- não

4- Alguma vez você bebeu logo ao acordar para acalmar os nervos ou se livrar de uma ressaca? 1- sim 2- não

Conclusão CAGE: 1- positivo (2 ou + respostas afirmativas às perguntas acima)

2 - negativo

3. HÁBITOS ALIMENTARES

Qual o adoçante que o(a) Sr.(a) utiliza?

- (1) aspartame (Finn, Adocyl em pó, Gold, Zero Cal em pó e líquido, Aspartame Lowçucar, Slim Swett, E-Qual Sweet, Multi-Adoçante Lowçucar, Stevia Classis Lowçucar em pó)
- (2) sacarina + ciclamato (Finn Cristal, Tal e Qual, Adocyl líquido, Zero Cal líquido, Assugrin, Doce Menor, Sucaryl, Adoçante Magro Lowçucar, Stevia Plus Lowçucar, Multi-Adoçante Lowçucar, Stevia Classis Lowçucar líquido)
- (3) stevia (Stevip, Stevioside Lowçucar, Stevia Plus Lowçucar, Stevia Classis Lowçucar em pó e líquido)
- (4) sucralose (Slim Linea, Splenda)
- (5) outro. Qual? _____
- (6) não usa adoçante artificial

Quantas porções de adoçante usualmente o(a) Sr.(a) consome por dia (refrigerante ou chá ou suco dietéticos, sobremesas dietéticas, adoçantes)*? Consumo = _____ porções/dia

* Considerando que 1 porção equivale a:

1 envelope de 1g ou 4 gotas de adoçante líquido (= 1 colher de chá) ou 150 ml de refrigerante ou suco adoçado artificialmente (= 1 copo pequeno) ou 1 porção (2g) de gelatina ou sobremesa diet

O(a) Sr.(a) faz uso de suplemento vitamínico? () Sim () Não

Se sim, qual e a dose? _____

Há quanto tempo? () Menos de 3 meses () 3 a 6 meses
() 6 meses a 1 ano () + de 1 ano

Quantas porções de alimentos ou bebidas ricas em cafeína o(a) Sr.(a) consome por dia (refrigerante, café, chá e/ou chimarrão)*? Consumo = _____ porções/dia

* Considerando que 1 porção equivale a: 150 ml [= 1 xícara de café ou chá (infusão)], ou 3 colheres de café solúvel, ou 150 ml [= 1 copo pequeno de refrigerante (coca-cola e guaraná)]

Consumo de frutas:

- * maçã, pêra, pêsego, ameixa, goiaba, banana e caqui = 1 porção média (unidade) ()
- * cítricos (laranja, lima, tangerina, maracujá, kiwi) = 1 unid. média ou ½ copo de suco ()
- * figo = 2 unidades médias ()
- * melão, mamão e melancia = 1 fatia média ou 1/8 ()
- * manga = ½ unidade média ()
- * abacaxi = ¼ ou ½ unidade pequena ()
- * uvas = 1 cacho com 15 bagos ()
- * abacate = 4 colheres de sopa ()

Consumo:

- | | |
|----------------------------------|------------------------|
| () nunca ou (-) de 1 porção/mês | |
| () 1 porção/mês | () 3-4 porções/semana |
| () 2-3 porções/mês | () 5-6 porções/semana |
| () 1 porção/semana | () 1 porção/dia |
| () 2 porções/semana | () 2 ou (+)/dia |

Consumo de vegetais dos tipos A e B* (exceto arroz)

(1 porção = ½ xícara ou 1 pires para as folhas verdes):

* batatas, abobrinha verde, chuchu, berinjela, feijões (lentilha, grão-de-bico, milho, ervilha), cenoura, beterraba, abóbora moranga, tomate, cebola, pimentão, pepino, brócolis, espinafre, mostarda, couve, repolho

- | | |
|----------------------------------|------------------------|
| () nunca ou (-) de 1 porção/mês | |
| () 1 porção/mês | () 3-4 porções/semana |
| () 2-3 porções/mês | () 5-6 porções/semana |
| () 1 porção/semana | () 1 porção/dia |
| () 2 porções/semana | () 2 ou (+)/ dia |

Vacina(s) nos últimos doze meses (quais e quantas doses):

4. ATIVIDADES

Profissão (atividades nos últimos dez anos): _____

Exposição a raios-X nos últimos dez anos (quantas vezes?): _____

Exercício físico: Não Sim Tipo de atividade e frequência (se parou, incluir há quanto tempo): _____

5. HISTÓRIA FAMILIAR

(Avaliação de história familiar de diabetes, pressão alta, problemas cardíacos e renais)

Definir como presença (SIM) quando:

- Diabetes: diagnóstico estabelecido ou tratamento com medicamentos específicos.
- Pressão alta: diagnóstico estabelecido ou tratamento com medicamentos específicos.
- Coração: história de infarto, angina ou morte súbita, relato médico/exames de isquemia ou procedimentos de revascularização miocárdica.
- Rins: história de diálise, ou tratamento para insuficiência renal em centro especializado, relato médico ou exames laboratoriais.
- Derrame: história e/ou seqüelas compatíveis.

5.1. INFORMAÇÃO DOS PAIS:

O pai e a mãe são vivos? PAI 1- sim 2- não MÃE 1- sim 2- não

Se falecidos, de que? PAI: _____

MÃE: _____

O seu pai e/ou mãe tem/tiveram?

	idade atual	diabete	derrame	coração	pressão alta	rim
pai						
mãe						

Outra(s) doença(s), qual(is)? _____

5.2. INFORMAÇÃO DOS IRMÃOS:

O Sr.(a) tem irmãos/irmãs? 1- sim 2- não

Se sim, quantos? _____ irmãos e _____ irmãs

Listar o nome dos irmãos, idade e perguntar: **O(s) seu(s) irmão(s) tem/tiveram?**

nome dos irmãos	sexo	idade	vivo	diabetes	derrame	coração	pressão alta	rim
1-								
2-								
3-								
4-								
5-								
6-								
7-								
8-								
9-								
10-								

5.3. OUTROS FAMILIARES DIABÉTICOS*:

Lado materno da família: **Avó** 1-sim 2 -não 9- não sabe (DM1, DM2, DMG)

Avô 1-sim 2-não 9- não sabe (DM1, DM2)

Tia, tio(s) 1-sim 2 -não 0-não sabe

(Se sim, quantos(as) com DM _____)*

Lado paterno da família: **Avó** 1-sim 2 -não 9- não sabe (DM1, DM2, DMG)

Avô 1-sim 2-não 9- não sabe (DM1, DM2)

Tia, tio(s) 1-sim 2 -não 0-não sabe

(Se sim, quantos(as) com DM _____)*

Outros: _____

* especificar tipo de diabetes, sexo e número de afetados em cada lado da família

(DM1, DM2, DMG).

5.4. DEFICIÊNCIA AUDITIVA:

Probando: 1- sim 2- não Tempo? _____

Familiares*: Lado materno da família: _____

Lado paterno da família: _____

* especificar sexo, número de afetados e o tempo de surdez.

6. EXAME FÍSICO

Peso: _____ kg Altura: _____ m IMC: _____ kg/m²

Especificar qual era o peso no período em que o diabetes foi diagnosticado?

_____ kg

Cintura: _____ cm Quadril: _____ cm Relação C/Q: _____

Hipertensão: 1- sim 2- não Uso de anti-hipertensivos: 1- sim 2- não

Especificar medicamento(s), dose e tempo de uso: _____

Pressão 1: _____ / _____ mmHg Pressão 2: _____ / _____ mmHg

Pressão 3: _____ / _____ mmHg

Hepatite: 1- sim 2- não HIV: 1- sim 2- não

Outras doenças e outros medicamentos (listar): _____

Palpação de pulsos periféricos: 1- palpável 2- não palpável

	MID	MIE
tibial posterior		
pedioso		

7. AVALIAÇÃO LABORATORIAL

DATA(S)				
glicose (mg/dl)				
glico-hemoglobina (%)				
frutosamina (mmol/L)				
colesterol total (mg/dl)				
HDL (mg/dl)				
triglicerídeos (mg/dl)				
LDL (mg/dl)				
proteína C (mg/L)*				
albumina (g/dl)*				
peptídeo C (ng/ml)*				
insulina (μUI/ml)*				
uréia (mg/dl)				
creatinina (mg/dl)				
albuminúria- amostra (mg/L)				
exc. urinária de albumina (μg/min)				
uréia urinária (g/24h)*				
EQU hematúria				
EQU proteinúria				
EQU-leucócitos /campo				
urocultura **				

* protocolos específicos ou quando indicados

** realizar apenas se EQU (qualitativo de urina) alterado

Ecografia de rins: (se disponível)

Laudo:

Data: ____ / ____ / ____

8. AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA

DATA(s)					
oftalmoscopia direta/indireta	OD OE				
angiografia	OD OE				
fotocoagulação com laser	OD OE				
examinador					
observações					

0-normal: 1-não proliferativa leve : 2-Não proliferativa grave 3:proliferativa

Obs: Descrição detalhada em anexo para o médico oftalmologista

9. AVALIAÇÃO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA

Força muscular e exame físico específico: presente = 0 ausente = 1

	direito	esquerdo
Reflexos profundos		
Aquileu		
Sensibilidade vibratória		
Hálux		
Index		
Pin-prick (agulha cabo/ponta)		
Hálux		
Index		
Monofilamento (10 g)		
Hálux		
Index		
Caminhar calcanhares		

Escore de sinais de exame físico (somar os pontos dos itens acima) = **MID** **MIE**

Neuropatia periférica presente se: somatório dos sinais de exame físico ≥ 3 tanto à DIREITA quanto à ESQUERDA **OU** apenas dificuldade de deambular nos calcanhares.

Conclusão: Diagnóstico de Neuropatia Periférica: 1- sim 2- não

Data: ____/____/____

10. AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR

10.1. QUESTIONÁRIO CARDIOVASCULAR (Questionário Rose):

A) **Angina** (dor no peito aos esforços)

1- Você teve **qualquer** tipo de dor ou desconforto no peito?

sim (1) não (2) **Se não, vá para o item C.**

A partir daqui, se a resposta escolhida estiver marcada com asterisco vá direto ao item “B”.

2- Tem dor quando **sobe escada/ lomba** ou caminha rápido?

sim (1) não (2)* Nunca se apressa ou sobe degraus (3)

3- Você tem dor no peito quando caminha a **passo normal em nível plano?**

sim (1) não (2)

4- **O que você faz** se tem a dor enquanto está caminhando?

- pára ou diminui a marcha (1) - continua caminhando igual (2)*

5- Se você permanece imóvel, o que acontece?

- a dor alivia (1) - a dor não alivia (2)*

6- Quanto **tempo** leva?

10 minutos ou menos (1) mais de 10 minutos (2)*

7- **Pode me mostrar onde é a dor?**

esterno região superior ou média (1) esterno na região inferior (2)

tórax anterior esquerdo (3) braço esquerdo (4)

outra(s) (5)

8- Você sente mais alguma coisa?

sim (1) não (2)

B) Possível IAM

9- Você já teve forte dor no peito por meia hora ou tempo mais prolongado?

sim (1) não (2)

C) Claudicação intermitente

A partir daqui, se a resposta escolhida estiver **marcada com asterisco**, não prosseguir.

10- Você tem dores nas pernas ao caminhar?

sim (1) **não (2)*** Em que perna? direita (1) esquerda (2)

11- Esta dor sempre inicia quando você está imóvel ou sentado?

sim (1)* não (2)

12- Em que parte da sua perna você sente a dor?

- a dor inclui a panturrilha (1) - **a dor não inclui a panturrilha (2)***

Se a panturrilha não for mencionada, perguntar: Algum outro local mais? _____

13- Tem dor quando sobe escada/lomba ou caminha rápido?

sim (1) **não (2)***

14- Você sente a dor quando caminha a passo normal em nível plano?

sim (1) não (2)

15- A dor sempre desaparece enquanto você está caminhando?

sim (1)* não (2)

16- O que você faz se tem a dor enquanto está caminhando?

- pára ou diminui a marcha (1) - **continua caminhando igual (2)***

17- O que acontece com a dor se você permanece imóvel?

- a dor alivia (1) - **a dor não alivia (2)***

18- Em quanto tempo? 10 minutos ou menos (1) mais de 10 minutos (2)

“SEGMENTO ST”

SÍTIO ANTERO-LATERAL (derivações DI, aVL e V₆):

PAREDE INFERIOR (derivações DII, DIII e aVF):

PAREDE INFERIOR (derivações DII, DIII e aVF):

“DEFEITO DE CONDUÇÃO VENTRICULAR”

BLOQUEIO COMPLETO DE RAMO ESQUERDO

Data: ____/____/____ **CONCLUSÃO:** **1- Normal 2- Anormal:**

2.1. provável infarto agudo do miocárdio: presença de onda Q (grande ou média) [1.1, 1.2] ou bloqueio completo de ramo esquerdo [7.1];

2.2. e/ou possível isquemia miocárdica: onda Q pequena [1.3] ou qualquer anormalidade no segmento ST [4.1, 4.2, 4.3] se acompanhadas por anormalidades da onda T [5.1 ou 5.2 ou 5.3].

10.3. ELETROCARDIOGRAMA DE ESFORÇO: 1- sim 2- não

Suspensão de fármacos que influenciem a frequência cardíaca: 1- sim 2- não

Listar fármacos suspensos: _____

Laudo: _____

Conclusão: _____

Data: ____/____/____

10.4. CINTILOGRAFIA MIOCÁRDIA COM ESTRESSE: 1- sim 2- não

Marcar o tipo de estudo: **Estresse físico** ou **farmacológico** (dipiridamol)

Suspensão de fármacos que influenciem a frequência cardíaca: 1- Sim 2- Não

Listar fármacos suspensos: _____

Fração de ejeção: _____

Observações: _____

Conclusão: 1- exame normal Data: ____/____/____

2- alteração **fixa** (hipoperfusão em repouso e estresse) = necrose

3- alteração **variável** (hipoperfusão somente no estresse) = isquemia

10.5. ANGIOGRAFIA CORONARIANA: 1- sim 2- não Data: ____/____/____

Laudo: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Declaro pelo presente que concordo em participar do projeto de pesquisa “Genética do Diabetes Mellitus e suas Complicações Crônicas”. Este projeto tem como objetivo buscar uma melhor compreensão dos fatores genéticos e clínicos relacionados ao desenvolvimento do diabetes mellitus e de suas complicações crônicas. Fui informado que o procedimento referente a este projeto envolve a retirada de uma amostra de 10 mL de sangue para análise, como ocorre em qualquer exame laboratorial de rotina, além de uma coleta de células da mucosa oral e uma entrevista. O DNA obtido da minha amostra bem como as informações obtidas na entrevista e nos exames laboratoriais serão utilizados de acordo com os objetivos descritos no presente projeto. Todo o material proveniente da coleta de sangue que não for utilizado no presente trabalho será desprezado. Me foi dada a liberdade de cancelar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo ao meu tratamento. Também foi dada a garantia de que não serei identificado(a) e que os dados referentes a mim são confidenciais. Foi explicado que não receberei medicação relacionada a este trabalho e que não terei gastos para participar deste estudo. Os dados referentes ao estudo são confidenciais, podendo ser acessados por mim, pelos pesquisadores diretamente envolvidos ou pelo médico responsável. Qualquer dúvida referente ao estudo será esclarecida pelo responsável por este trabalho. Por este instrumento, tomo parte voluntariamente no presente estudo.

Data: _____ / _____ / _____

.....

assinatura do paciente

.....

assinatura do médico responsável

.....

assinatura de testemunha

ANEXO II – Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos 703 pacientes com DM2 analisados no presente estudo

Variáveis	Caucasóides	Negróides	p
<i>n</i>	520	183	-----
Sexo (homens/mulheres)	242/278	67/116	0,025
Idade (anos)	61,0 ± 9,7	58,3 ± 10,7	0,001
Tempo de DM (anos)	14,8 ± 8,5	13,3 ± 6,6	0,180
Glico-hemoglobina (%)	6,7 ± 1,8	7,0 ± 2,2	0,362
Tabagismo (%)	44	34	0,028
Hipertensão (%)	77	82	0,176
Pressão sistólica (mmHg)	144 ± 24	145 ± 24	0,575
Pressão diastólica (mmHg)	85 ± 12	87 ± 14	0,111
Índice de massa corporal (kg/m ²)	28,4 ± 4,6	28,6 ± 5,4	0,888
Creatinina (mg/dl)	0,9 (0,4-11,6)	0,9 (0,5-17,9)	0,440
Uso regular de insulina	41	50	0,039
Colesterol total (mg/dl)	218 ± 46	215 ± 55	0,181
HDL colesterol (mg/dl)	42 ± 11	48 ± 15	< 0,001
Triglicerídeos (mg/dl)	153 (35-1470)	134 (37-1260)	0,001
Síndrome metabólica (%)	89	87	0,497
Retinopatia diabética (%)	66	63	0,675
Nefropatia diabética (%)	57	59	0,677
Cardiopatia isquêmica (%)	51	57	0,277

Os dados são apresentados como médias ± desvio padrão ou como %. A creatinina e os triglicerídeos, sem distribuição normal, são apresentados como mediana e intervalo.

ANEXO III – Tabela 2. Frequências gênicas e genotípicas obtidas para os 11 polimorfismos analisados no presente estudo

Polimorfismos	<u>Caucasóides</u>		<u>Negróides</u>		
	DM2 (RS)	doadores (RS)	DM2 (RS)	doadores (RJ)	normoglicêmicos (RS)
RAGE –429T>C	519	100	183	100	96
T/T	401 (77%)	76 (76%)	141 (77%)	86 (86%)	73 (76%)
T/C	107 (21%)	22 (22%)	40 (22%)	13 (13%)	23 (24%)
C/C	11 (2%)	2 (2%)	2 (1%)	1 (1%)	-----
T	0,88	0,87	0,88	0,92	0,88
C	0,12	0,13	0,12	0,08	0,12
RAGE –374T>A	518	100	183	100	96
T/T	241 (46%)	54 (54%)	96 (52%)	62 (62%)**	57 (60%)
T/A	211 (41%)	35 (35%)	58 (32%)	19 (19%)	29 (30%)
A/A	48 (9%)	9 (9%)	13 (7%)	-----	3 (3%)
T/del	14 (3%)	2 (2%)	15 (8%)	17 (7%)	6 (6%)
A/del	4 (1%)	-----	1 (1%)	2 (2%)	1 (1%)
T	0,69	0,73	0,76	0,88	0,81
A	0,31	0,27	0,24	0,12	0,19

* Frequências genotípicas observadas não estão de acordo as esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

** Valor de $p < 0,05$ para a comparação entre os pacientes com DM2 e os doadores de banco de sangue do respectivo grupo étnico.

Continuação (tabela 2)

Polimorfismos	Caucasóides		Negróides		
	DM2 (RS)	doadores (RS)	DM2 (RS)	doadores (RJ)	normoglicêmicos (RS)
RAGE I/D 63-pb	520	100	183	100	102
I/I	502 (96%)	98 (98%)	167 (91%)	81 (81%)**	95 (93%)
I/D	18 (4%)	2 (2%)	16 (9%)	19 (19%)	7 (7%)
I	0,98	0,99	0,96	0,90	0,97
D	0,02	0,01	0,04	0,10	0,03
AR -106C>T	465	174	165	54	62
C/C	172 (37%)*	75 (43%)	88 (53%)*	34 (63%)**	33 (53%)
C/T	203 (44%)	78 (45%)	56 (34%)	20 (37%)	23 (37%)
T/T	90 (19%)	21 (12%)	21 (13%)	-----	6 (10%)
C	0,59	0,66	0,70	0,81	0,72
T	0,41	0,34	0,30	0,19	0,28
eNOS -786T>C	520	100	182	100	
T/T	211 (40%)	42 (42%)	100 (55%)	67 (67%)	
T/C	228 (44%)	46 (46%)	67 (37%)	27 (27%)	
C/C	81 (16%)	12 (12%)	15 (8%)	6 (6%)	-----
T	0,62	0,65	0,73	0,80	
C	0,38	0,35	0,27	0,20	

* Frequências genotípicas observadas não estão de acordo as esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

** Valor de $p < 0,05$ para a comparação entre os pacientes com DM2 e os doadores de banco de sangue do respectivo grupo étnico.

Continuação (tabela 2)

Polimorfismos	Caucasóides		Negróides		
	DM2 (RS)	doadores (RS)	DM2 (RS)	doadores (RJ)	normoglicêmicos (RS)
eNOS 894G>T	515	100	183	100	92
G/G	246 (48%)	47 (47%)	102 (56%)*	72 (72%)**	73 (79%)
G/T	230 (45%)	48 (48%)	76 (41%)	25 (25%)	18 (20%)
T/T	39 (7%)	5 (5%)	5 (3%)	3 (3%)	1 (1%)
G	0,70	0,71	0,77	0,84	0,89
T	0,30	0,29	0,23	0,16	0,11
PON1 -108T>C	518	100	183	100	96
T/T	132 (25%)	31 (31%)	31 (17%)*	4 (4%)**	9 (9%)
T/C	248 (48%)	49 (49%)	64 (35%)	30 (30%)	36 (38%)
C/C	138 (27%)	20 (20%)	88 (48%)	66 (66%)	51 (53%)
T	0,49	0,56	0,34	0,19	0,28
C	0,51	0,44	0,66	0,81	0,72
PON1 Q192R	518	100	183	100	92
Q/Q	221 (43%)	48 (48%)	43 (24%)	14 (14%)**	22 (24%)
Q/R	231 (44%)	37 (37%)	90 (49%)	45 (45%)	33 (36%)
R/R	66 (13%)	15 (15%)	50 (27%)	41 (41%)	37 (40%)
Q	0,65	0,66	0,48	0,36	0,42
R	0,35	0,34	0,52	0,64	0,58

* Frequências genótípicas observadas não estão de acordo as esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

** Valor de $p < 0,05$ para a comparação entre os pacientes com DM2 e os doadores de banco de sangue do respectivo grupo étnico.

Continuação (tabela 2)

Polimorfismos	Caucasóides		Negróides		
	DM2 (RS)	doadores (RS)	DM2 (RS)	doadores (RJ)	normoglicêmicos (RS)
PON2 S311C	512	100	179	100	
S/S	329 (64%)	67 (67%)	108 (60%)	49 (49%)	
S/C	163 (32%)	30 (30%)	61 (34%)	45 (45%)	-----
C/C	20 (4%)	3 (3%)	10 (6%)	6 (6%)	
S	0,80	0,82	0,77	0,72	
C	0,20	0,18	0,23	0,28	
p22phox 242C>T	513	100	181	100	
C/C	223 (43%)	47 (47%)	66 (37%)	36 (36%)	
C/T	230 (45%)	41 (41%)	96 (53%)	44 (44%)	-----
T/T	60 (12%)	12 (12%)	19 (10%)	20 (20%)	
C	0,66	0,68	0,63	0,58	
T	0,34	0,32	0,37	0,42	
CAT -262 C>T	518	100	182	100	97
C/C	333 (64%)	67 (67%)	139 (76%)	88 (88%)**	84 (87%)
C/T	163 (32%)	29 (29%)	42 (23%)	12 (12%)	13 (13%)
T/T	22 (4%)	4 (4%)	1 (1%)	-----	-----
C	0,80	0,82	0,88	0,94	0,93
T	0,20	0,18	0,12	0,06	0,07

* Frequências genotípicas observadas não estão de acordo as esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

** Valor de $p < 0,05$ para a comparação entre os pacientes com DM2 e os doadores de banco de sangue do respectivo grupo étnico.

ANEXO IV – Tabela 3. Freqüências haplotípicas obtidas para os polimorfismos nos genes do RAGE, da eNOS e da PON1/PON2

Haplótipos	<u>Caucasóides</u>		<u>Negróides</u>		
	DM2 (RS)	doadores (RS)	DM2 (RS)	doadores (RJ)	normoglicêmicos (RS)
RAGE	996	196	332	162	174
-429T/-374A	306 (30,7%)	53 (27,0%)	82 (24,7%)	17,5 (10,8%)*	35 (20,0%)
-429C/-374A	-----	-----	-----	1,5 (0,9%)	-----
-429T/-374T	565 (56,7%)	119 (60,7%)	208 (62,6%)	131,5 (81,2%)	117 (67,0%)
-429C/-374T	125 (12,6%)	24 (12,3%)	42 (12,7%)	11,5 (7,1%)	22 (13,0%)
	D' = -1 (p < 0,001)	D' = -1 (p = 0,001)	D' = -1 (p = 0,005)	D' = 0,01 (p = 0,971)	D' = -1 (p = 0,011)
eNOS	1030	200	364	200	
-786T/894T	93 (9,0%)	24 (12,0%)	24 (7,0%)	15 (7,5%)*	
-786T/894G	548 (53,0%)	106 (53,0%)	226 (62,0%)	146 (73,0%)	
-786C/894T	215 (21,0%)	34 (17,0%)	78 (21,0%)	16 (8,0%)	-----
-786C/894G	174 (17,0%)	36 (18,0%)	36 (10,0%)	23 (11,5%)	
	D' = 0,52 (p < 0,001)	D' = 0,36 (p = 0,002)	D' = 0,88 (p < 0,001)	D' = 0,39 (p = 0,003)	

* Valor de p < 0,05 para a comparação entre os pacientes com DM2 e os doadores de banco de sangue do respectivo grupo étnico.

Continuação (tabela 3)				
Haplótipos	<u>Caucasóides</u>		<u>Negróides</u>	
	DM2 (RS)	doadores (RS)	DM2 (RS)	doadores (RJ)
PON1/PON2	1018	196	358	196
-108T/192Q/311C	12 (1,2%)	-----	-----	0,3 (0,1%)*
-108T/192Q/311S	367 (36,0%)	78 (39,8%)	87 (24,3%)	22 (11,2%)
-108T/192R/311C	1 (< 0,1%)	1 (0,6%)	2 (0,5%)	3,7 (1,9%)
-108T/192R/311S	124 (12,2%)	30 (15,3%)	35 (9,8%)	12 (6,1%)
-108C/192Q/311C	94 (9,2%)	24 (12,2%)	30 (8,4%)	19 (9,7%)
-108C/192Q/311S	187 (18,4%)	29 (14,8%)	55 (15,4%)	30 (15,3%)
-108C/192R/311C	96 (9,4%)	9 (4,6%)	49 (13,7%)	33 (16,9%)
-108C/192R/311S	137 (13,5%)	25 (12,7%)	100 (27,9%)	76 (38,8%)
-108T>C e Q192R	D' = 0,30 (p < 0,001)	D' = 0,11 (p = 0,350)	D' = 0,43 (p < 0,001)	D' = 0,38 (p = 0,011)
Q192R e S311C	D' = 0,23 (p < 0,001)	D' = -0,18 (p = 0,673)	D' = -0,18 (p = 0,155)	D' = -0,01 (p = 0,821)
-108T>C e S311C	D' = 0,90 (p = 0,002)	D' = 0,86 (p < 0,001)	D' = -0,95 (p < 0,001)	D' = -0,59 (p = 0,047)

* Valor de p < 0,05 para a comparação entre os pacientes com DM2 e os doadores de banco de sangue do respectivo grupo étnico.