Relação dos polimorfismos funcionais -509C>t e 869T>C no gene do TGFβ1 com a retinopatia e nefropatia diabéticas em pacientes com diabetes mellitus tipo 2

Relationship of functional polymorphisms -509C>T and 869T>C in the TGFβ1 gene with diabetic retinopathy and nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus

Michel Broilo Manica[1], Cyntia Fagundes Garcia[2], Kátia Gonçalves dos Santos[3]

RESUMO

Introdução: O fator de crescimento transformante beta-1 (TGFβ1) é uma citocina multifuncional que regula a proliferação, a diferenciação e a formação da matriz extracelular de vários tipos de células. Existem evidências de que os polimorfismos -509C > T e 869T > C no gene do TGFβ1 alteram a sua expressão gênica e podem estar envolvidos na patogênese das complicações crônicas do diabetes mellitus tipo 2 (DM2). O objetivo deste estudo foi analisar o papel dos polimorfismos funcionais -509C > T e 869T > C no gene do TGFβ1 na patogênese da retinopatia (RD) e da nefropatia (ND) diabéticas, em pacientes com DM2. **Métodos:** Foi realizado um estudo de caso-controle aninhado a um estudo transversal. Foram selecionados pacientes caucasoides com DM2 que realizaram exames clínicos, laboratoriais e uma entrevista com questionário padronizado. A genotipagem dos polimorfismos foi realizada por meio de PCR. **Resultados:** As frequências genotípicas e alélicas obtidas para o polimorfismo -509C > T nos pacientes com RD ou ND não diferiram daquelas observadas nos pacientes sem estas complicações. Mas quando a gravidade das complicações foi analisada, observou-se que o alelo C foi menos frequente entre os pacientes com insuficiência renal crônica não tratada com diálise, assim como a frequência de homozigotos para o alelo C foi maior nos pacientes dialíticos. **Conclusão:** Após a análise multivariada, o genótipo CC permaneceu como um fator de risco associado com a progressão da ND (RC = 2,68, IC 95% 1,08-6,68). Assim, os resultados sugerem que o polimorfismo 869T > C no gene do TGFβ1 está associado com a progressão da ND em pacientes com DM2.

UNITERMOS: Retinopatia Diabética, Fator de Crescimento Transformador Beta, Nefropatias Diabéticas, Diabetes Mellitus Tipo 2.

ABSTRACT

Introduction: *The transforming growth factor-beta 1 (TGFβ1) is a multifunctional cytokine that regulates proliferation, differentiation and extracellular matrix formation of multiple cell types. There is evidence that polymorphisms -509C> T and 869T> C in the TGFβ1 gene alter its gene expression and may be involved in the pathogenesis of chronic complications of diabetes mellitus type 2 (DM2). The aim of this study was to analyze the role of functional polymorphisms -509C> T and 869T> C in the TGFβ1 gene in the pathogenesis of diabetic retinopathy (DR) and diabetic nephropathy (DN) in patients with DM2.* ***Methods:*** *We conducted a case-control study nested in a cross-sectional study. We selected Caucasian patients with DM2 who underwent clinical and laboratory tests and an interview with a standardized questionnaire. Polymorphism genotyping was performed by PCR.* ***Results:*** *The allele and genotype frequencies obtained for polymorphism -509C> T in patients with DR or DN did not differ from those observed in patients without these complications. But when the severity of complications was analyzed, the C allele was found to be less frequent among patients with chronic renal failure untreated with dialysis, and the frequency of homozygous for the C allele was higher in dialysis patients.* ***Conclusion:*** *After multivariate analysis, the CC genotype remained a risk factor associated with progression of DN (OR = 2.68, 95% CI 1.08 to 6.68). Thus, the results suggest that polymorphism 869T> C in THE TGFβ1 gene is associated with progression of DN in patients with DM2.*

KEYWORDS: *Diabetic Retinopathy, Transforming Growth Factor Beta, Diabetic Nephropathies, Diabetes Mellitus Type 2.*

[1] Pós-graduado em Diagnóstico Genético e Molecular. Médico Oftalmologista.
[2] Graduado em Medicina. Médica residente em Oftalmologia.
[3] Doutora em genética e biologia molecular. Professora adjunta da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde; Professora colaboradora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da UFRGS.

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre os adultos no mundo. Embora o controle glicêmico contribua para a suscetibilidade às complicações crônicas do DM, algumas pessoas com controle estrito desenvolvem complicações, como a retinopatia diabética (RD) e a nefropatia diabética (ND). Isto também sugere uma contribuição genética para o desenvolvimento dessas doenças (1, 2).

Quanto às complicações microvasculares, 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. Morfologicamente, essas alterações se caracterizam pela constrição progressiva dos vasos sanguíneos, pelo espessamento da membrana basal dos capilares e pelo aumento da permeabilidade às proteínas plasmáticas (3). Clinicamente, os maiores problemas são: a retinopatia – DM é a causa não traumática mais frequente de cegueira em adultos (4); a nefropatia – DM é a principal causa de falência e transplante renal (5); e a neuropatia – DM é a principal causa de amputação dos membros inferiores em países em desenvolvimento (6).

As bases moleculares e celulares da fisiopatologia das complicações vasculares do DM ainda não foram completamente elucidadas. No entanto, sabe-se que o desenvolvimento da angiopatia diabética envolve alterações funcionais e estruturais na vasculatura (7).

A RD é uma microangiopatia que primariamente afeta as arteríolas pré-capilares e vênulas pós-capilares, embora vasos maiores também possam estar envolvidos, e é comum nos pacientes com DM, constituindo a principal causa de cegueira neste grupo (8). Um dos sinais clínicos mais precoces detectáveis na RD é o aumento da permeabilidade vascular devido à quebra da barreira hematorretiniana, que causa o edema macular. Seguem-se, mais tardiamente, microaneurismas, exsudatos e, finalmente, proliferação vascular. Desses achados clínicos, o edema macular é o mais proximamente correlacionado com o grau de perda visual (9).

Estudos epidemiológicos demonstraram que a hiperglicemia e o tempo de duração do DM são os principais fatores de risco para o desenvolvimento e a progressão da RD (10, 4). Outros fatores, tais como a hipertensão arterial sistêmica (HAS) e a hipercolesterolemia, também têm sido implicados na patogênese desta complicação (11). Apesar do risco de desenvolvimento desta complicação aumentar com um controle glicêmico ruim, existem vários indicadores sugerindo que a ocorrência ou progressão da RD também depende de fatores genéticos (4, 12, 13). Um estudo em pacientes com DM2 atendidos nos ambulatórios de três centros médicos gaúchos observou que a frequência de RD foi de 48%, dos quais 15% apresentavam RD proliferativa (14).

A ND é uma síndrome clínica caracterizada por albuminúria persistente, declínio na taxa de filtração glomerular e pressão arterial elevada (15). A ND é a principal causa de doença renal crônica terminal (DRC) e de reposição da função renal nos Estados Unidos, na Europa e no Brasil (16, 17, 5).

Os estudos populacionais e familiares têm demonstrado que as complicações crônicas do DM, embora sejam dependentes do controle glicêmico e do tempo de duração do DM, resultam de uma complexa interação entre vários fatores genéticos e ambientais (18, 19, 13).

Apesar do controle glicêmico poder diminuir a progressão da RD ou da ND já estabelecida, parte dos portadores de DM irá, a despeito do bom controle glicêmico, desenvolver ou avançar a doença ocular ou renal, sugerindo que outros fatores estão envolvidos nesse processo (20, 13, 19).

O fator de crescimento transformante β1 (TGFβ1) é um peptídeo multifuncional que regula a proliferação, a diferenciação, a formação da matriz extracelular e outras funções em vários tecidos e órgãos, incluindo o rim, os ossos, a pele, os pulmões, o fígado e o sistema cardiovascular. Um desequilíbrio na ativação e sinalização do TGFβ1 pode levar à apoptose (21, 22).

O gene do TGFβ1 localiza-se no cromossomo 19q13 (23) e contém sete éxons que originam uma proteína madura de 112 aminoácidos (24). Vários SNPs (do inglês, *single nucleotide polymorphism*) no gene do TGFβ1 têm sido descritos, incluindo o polimorfismo funcional -509C>T (rs1800469) na região promotora e as variantes funcionais 869T>C (Leu10Pro) (rs1800470; anteriormente denominado rs1982073) e 915G>C (Arg25Pro) na região codificadora, que levam à troca de aminoácido (25, 26, 27, 28).

Foi demonstrado que o polimorfismo -509C>T na região promotora do gene do TGFβ1 altera os níveis protéicos de TGFβ1 (27), com a presença do alelo T resultando em um aumento dos níveis plasmáticos desta proteína (7). No entanto, os estudos de associação não observaram uma relação deste polimorfismo com a RD em tchecos (29) e poloneses (30) com DM2. Além disso, não foi encontrada nenhuma associação do polimorfismo -509C>T com a ND em poloneses (30) e com a DRC em indianos (31) com DM2.

O objetivo deste estudo foi analisar o papel dos polimorfismos funcionais -509C>T e 869T>C no gene do fator de crescimento transformante β1 (TGFβ1) na patogênese da retinopatia e da nefropatia diabéticas, em pacientes ambulatoriais com DM2.

MÉTODOS

Foi realizado um estudo de caso-controle aninhado a um estudo transversal. A população alvo foram pacientes caucasoides com DM2 atendidos nos ambulatórios

dos Serviços de Endocrinologia dos seguintes hospitais: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Grupo Hospitalar Conceição (Porto Alegre/RS), Hospital São Vicente de Paulo (Passo Fundo/RS), Hospital Universitário de Rio Grande e Fundação Universitária de Rio Grande (Rio Grande/RS). Para a amostra, foram selecionados indivíduos caucasoides a partir de um banco de dados de aproximadamente 2.500 pacientes com DM2, participantes de um estudo multicêntrico que teve início em 2002 e que encontra-se em andamento no Estado do Rio Grande do Sul (32, 33). Também foram incluídos, nessa seleção, caucasoides doadores do banco de sangue do HCPA, sem história pessoal ou familiar de DM, avaliados por meio de uma entrevista com questionário, que constituíram a amostra de referência para a avaliação da distribuição dos polimorfismos na população em geral. Assim, foram analisados 828 pacientes com DM2 (414 mulheres e 414 homens; com média de idade de 61 ± 10 anos; e tempo de duração do diabetes igual a 14 ± 8 anos) e 182 indivíduos saudáveis (123 homens e 59 mulheres; com média de idade de 45 ± 8 anos).

Os pacientes com DM2 foram classificados em casos ou controles, de acordo com a presença ou ausência de RD e/ou ND, consideradas separadamente (434 com RD e 213 sem RD; 492 com ND e 227 sem ND). Os controles tinham que ter, no mínimo, 10 anos de DM para serem incluídos no estudo. Como nem todos os pacientes realizaram os exames necessários para o diagnóstico dessas duas complicações, o número de pacientes avaliados para a RD e para a ND é diferente. Todos os pacientes avaliados neste estudo realizaram exames clínicos, laboratoriais e uma entrevista (por meio de questionário padronizado), após a assinatura do termo de consentimento informado, cujo protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UL-BRA (processo número 274H/2009), pelos CEPs das demais instituições envolvidas e pelo CONEP (processo nº 25.000.001623/2003-72, parecer 258/2003).

Os níveis de glicose foram determinados pelo método da glicose oxidase, a creatinina pela reação de Jaffé, a glico-hemoglobina pela técnica de HPLC – troca iônica (valores de referência: 4,7-6,0%), os triglicerídeos e os níveis de colesterol por métodos enzimáticos. A excreção urinária de albumina (EUA) foi quantificada por meio da técnica de imunoturbidimetria em amostras de urina de 24h com tempo marcado (três amostras por paciente com 15 dias de intervalo). A presença de micro ou macroalbuminúria foi confirmada por pelo menos duas medidas com intervalo de três a seis meses.

A ND foi definida pelo aumento na EUA na ausência de infecção urinária ou outras anormalidades renais. A ND foi classificada em ND incipiente (microalbuminúria) (EUA 20-199 mg/min ou 17-174 mg/L) ou ND clínica. A ND clínica foi definida pela presença de macroalbuminúria (EUA ^{3}200 mg/min ou >174 mg/L) ou pela presença de insuficiência renal crônica tratada com diálise quando outras causas de proteinúria ou doença renal foram afastadas.

A presença de RD foi avaliada por meio da fundoscopia direta após dilatação pupilar e foi classificada como: (1) ausente; (2) RD não proliferativa (microaneurismas, hemorragia, exsudatos duros); ou (3) RD proliferativa (presença de neovasos e/ou tecido fibroso na cavidade vítrea).

A avaliação da presença de neuropatia foi realizada por meio da pesquisa de reflexos tendinosos profundos e avaliação da sensibilidade vibratória e tátil.

O DNA foi extraído de uma amostra de sangue periférico por um método de *salting out* (34). Os polimorfismos -509C>T e 869T>C no gene do TGFβ1 foram identificados por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, utilizando-se os *primers* e sondas contidos em ensaios específicos para a genotipagem destas variantes (*Human Custom TaqMan® Genotyping Assay* 40X, Applied Biosystems, Foster City, USA). Uma sonda alélica foi marcada com o fluoróforo VIC e a outra foi marcada com o fluoróforo FAM. As reações foram feitas em um volume final de 5 (polimorfismo -509C>T) ou 10 mL (polimorfismo 869T>C) utilizando-se 2 e 10 ng de DNA genômico, respectivamente. As reações ocorreram em um termociclador para PCR em tempo real (7500 *Fast Real PCR System*; Applied Biosystems), com desnaturação inicial a 95°C por 10 min., seguida por 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e anelamento/extensão a 63°C por 1 min. Os dados da fluorescência obtidos para cada placa foram analisados em um programa específico para esse fim (SDS 2.1; Applied Biosystems).

As comparações entre os grupos de indivíduos foram realizadas por meio de testes paramétricos e não paramétricos, conforme indicado de acordo com o tipo de distribuição da variável quantitativa, utilizando-se o pacote estatístico SPSS. As frequências alélicas foram determinadas pela contagem direta dos alelos e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado por meio do teste de qui-quadrado. As diferenças nas distribuições gênicas e genotípicas entre os grupos de indivíduos foram avaliadas por meio do teste de qui-quadrado ou do teste exato de Fisher, conforme indicado. Também foi realizado análise de regressão logística multivariada para avaliar o efeito do polimorfismo 869T>C no gene do TGFβ1 na disfunção renal avançada (tratada com diálise), controlando-se para os demais fatores clínicos associados com esse desfecho.

Para calcular o poder do estudo foi usado o programa PEPI (35), utilizado para avaliar o desenvolvimento e/ou progressão da RD para ambos polimorfismo.

O desequilíbrio de ligação (LD) entre os dois polimorfismos foi calculado e expresso em termos de D' e r^2 (36). As frequências haplotípicas foram estimadas por um método Bayesiano utilizando-se o programa PHASE versão 2.1 (37,38). O aplicativo PHASE também foi usado para comparar a distribuição dos diferentes haplótipos entre os casos e controles. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

As frequências alélicas obtidas para os polimorfismos -509C > T e 869T > C nos pacientes com DM2 não diferiram significativamente daquelas observadas no grupo de doadores de sangue (Tabela 1). Além disso, as frequências genotípicas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes com DM2 e os doadores do banco de sangue para o polimorfismo -509C > T. Quanto ao polimorfismo 869T > C, o genótipo TT foi mais frequente nos pacientes com DM2 do que na população em geral. Porém, essa diferença foi somente tangencial à significância estatística. As frequências genotípicas observadas não estavam de acordo com as esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg para ambos os polimorfismos entre os pacientes com DM2.

Foi observado que os pacientes com RDP apresentam níveis menores de colesterol HDL, níveis mais elevados de creatinina, uso mais frequente de insulina e maior frequência de nefropatia do que os pacientes sem RD. Além disso, a presença de RDP foi mais freqüente nos homens.

Em relação às frequências alélicas e dos genótipos para o polimorfismo -509C > T, não houve diferenças entre os pacientes sem RD quando comparados aos pacientes com RD.

Quanto ao polimorfismo 869T > C, as frequências genotípicas observadas nos pacientes com RD (TT = 36,0%, TC = 40,9%, CC = 23,1%) não diferiram significativamente daquelas observadas nos pacientes sem essa complicação (TT = 34,6%, TC = 43,6%, CC = 21,8%) (p = 0,881). Além disso, as frequências alélicas foram idênticas nos dois grupos de pacientes (T = 0,56 e C = 0,44) (p > 0,999).

Da mesma forma, quando se levou em consideração a gravidade da RD, foi observado que as frequências genotípicas e alélicas foram similares entre os grupos (Tabela 2).

A Tabela 3 mostra as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com normoalbuminúria, microalbuminúria, macroalbuminúria, em diálise e com doença renal crônica (DRC). Resumidamente, os pacientes com disfunção renal mais avançada (DRC e diálise) tinham níveis mais elevados de triglicerídeos e uma prevalência maior de RD, cardiopatia isquêmica e uso de insulina do que os normoalbuminúricos. Os pacientes dialíticos apresentaram níveis menores de colesterol total em comparação aos demais grupos de pacientes e tinham diabetes por mais tempo do que os microalbuminúricos. Além disso, os pacientes em diálise eram menos obesos e apresentaram níveis mais elevados de creatinina sérica e níveis menores de colesterol HDL e LDL do que os pacientes com normoalbuminúria.

As frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo -509C > T nos pacientes com ND não foram estatisticamente diferentes daquelas observadas nos pacientes sem ND. Quanto ao polimorfismo 869T > C, as frequências alélicas e genotípicas observadas nos pacientes com ND também não

TABELA 1 – Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos no gene do TGFβ1 nos pacientes com DM2 e nos doadores de banco de sangue

Polimorfismo		Doadores de sangue n (%)	Pacientes com DM2 n (%)	*p**
-509C>T		171	798	
Genótipos	CC	65 (38,0)	334 (41,9)	0,233
	CT	80 (38,0)	318 (39,8)	x
	TT	26 (15,2)	146 (18,3)	x
Alelos	C	210 (61,0)	986 (62,0)	0,945
	T	132 (39,0)	610 (38,0)	x
869T>C (Leu10Pro)	126	371		
Genótipos	TT	32 (25,4)	130 (35,0)	0,053
	TC	68 (54,0)	156 (42,0)	
	CC	26 (20,6)	85 (23,0)	
Alelos	T	132 (52,4)	416 (56,0)	0,346
	C	120 (47,6)	326 (44,0)	

Os valores de p foram calculados a partir de tabelas de contingência comparando pacientes com DM2 contra doadores de sangue. n= número de indivíduos (%).

TABELA 2 – Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos no gene do TGFβ1 de acordo com a presença e gravidade da retinoplastia diabética

Polimorfismo		Sem RD, n (%)	RDNP, n (%)	RDNP, n (%)	*p**
-509C>T		196	247	175	
Genótipos	CC	87 (44,4)	105 (42,5)	80 (45,7)	0,502
	CT	68 (34,7)	99 (40,1)	62 (35,4)	
	TT	41 (20,9)	43 (17,4)	33 (18,9)	
Alelos	C	0,62	0,63	0,63	0,893
	T	0,38	0,37	0,37	
869T>C (Leu10Pro)		133	103	105	
Genótipos	TT	46 (34,6)	32 (31,1)	43 (40,6)	0,642
	TC	58 (43,6)	47 (45,6)	38 (36,8)	
	CC	29 (21,8)	24 (23,3)	24 (22,6)	
Alelos	T	0,56	0,54	0,59	0,578
	C	0,44	0,46	0,41	

Os valores de *p* foram calculados a partir de tabelas de contingência comparando pacientes com DM2 de acordo com a presença e o grau de severidade da RD. n= número de indivíduos (%).

TABELA 3 – Características clínicas dos pacientes com DM2 de acordo com a gravidade da nefropatia diabética

Características	Normoalbuminúria	Microalbuminúria	Macroalbuminúria	DRC	Diálise	*p**
Sexo (homem/mulher)	227 (101/126)	219 (112/107)	96 (57/39)	41 (24/17)	136 (86/50)	0,221
Idade (anos)	61,7 ± 8,8	60,2 ± 10,0	62,0 ± 8,9	59 ± 9,2	62,0 ± 11,2	0,054
Duração do diabetes (anos)	15,9 ± 5,9*	11,9 ± 8,5*	14,5 ± 8,5**	15,2 ± 9,9**	17,1 ±8,8*	<0,001
IMC (Kg/m^2)	28,1 ± 4,5*	29,1 ± 4,9**	29,9 ± 5,6*	28,7 ± 4,0*	26,2 ± 4,2***	0,027
História de tabagismo** (%)	41,8	48,5	45,8	51,3	56,7	0,194
Hipertensão (%)	72,3	75,0	78,6	81,1	85,7	0,275
Pressão sistólica (mmHg)	142 ± 22	143 ± 24	150 ± 27	154 ± 28	147 ± 22	0,111
Pressão distólica (mmHg)	85 ± 12	86 ± 15	86 ± 13	88 ± 13	83 ± 10	0,093
Glico-hemoglobina (%)	7,0 ± 1,8	7,3 ± 1,9	7,2 ± 2,0	6,5 ± 2,3	6,8 ± 1,8	0,145
Uso regular de insulina (%)	34,6*	36,6*	60,0*	82,1*	54,0*	<0,001
Colesterol total (mg/dL)	209 ± 45*	206 ± 48*	222 ± 47*	211 ± 56*	180 ± 47*	<0,001
Colesterol HDL (mg/dL)	47 ± 11*	44 ± 12**	42 ± 11**	42 ± 12***	38 ± 12*	<0,001
Colesterol LDL (mg/dL)	129 ± 42*	124 ± 41*	148 ± 53	137 ± 47**	99 ± 41*	<0,001
Triglicerídeos (mg/dL)	168 (27-546)*	204 (44-1470)**	236 (47-1265)*	215 (101-716)*	244 (49-9000)*	<0,001
Creatinina sérica (mg/dL)	0,9 (0,5-2,2)*	0,97 (0,4-2,2)*	1,2 (0,6-3,4)*	2,7 (1,6-5,6)**	6,9 (1,5-13,9)*	<0,001
Retinoplastia diabética (%)	44,2*	72,0*	79,7**	94,1*	87,6*	<0,001
Cardiopatia isquêmica (%)	33,5*	32,4*	44,6**	61,1*	59,0*	<0,001

Os dados estão demonstrados como média ± desvio padrão, mediana (amplitude) ou percentual.
* Os valores de *p* foram calculados por meio dos testes x2. ANOVA ou Kruskal-Wallis, utilizando o teste de Tukey para comparações múltiplas "post-hoc".
** A história de tabagismo foi considerada como sendo positiva para ex-fumantes e fumantes atuais.
*** As letras sobrescritas representam comparações estatísticas entre média e proporções. Letras iguais significam que as médias ou proporções não são diferentes, enquanto que letras diferentes representam deferenças estatisticamente significativas entre as médias e proporções (p<0,05).

TABELA 4 – Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos no gene do TGFβ1 de acordo com a presença e gravidade da nefropatia diabética

Polimorfismo		Normoalbuminúria n (%)	Microalbuminúria n (%)	Macroalbuminúria n (%)	DRC n (%)	Diálise n (%)	*p**
-509C>T		248	212	95	38	135)	
Genótipos	CC	114 (46,0)	80 (37,7)	42 (44,2)	15 (39,5)	54 (40,0)	0,793
	CT	92 (37,1)	88 (39,8)	36 (37.9)	18 (47,4)	52 (38,5)	
	TT	42 (16,9)	44 (18,3)	17 (17,9)	5 (13,2)	29 (21,5)	
Alelos	C	0,64	0,58	0,63	0,63	0,590,353	
	T	0,36	0,42	0,37	0,37	0,41	
869T>C (Leu10Pro)		155	86	35	15	46	
Genótipos	TT	59 (38,1)	23 (35,0)	12 (34,3)	8 (53,3)	17 (37,0)	0,063
	TC	63 (40,6)	39 (42,0)	16 (45,7)	7 (46,7)	12 (26,0)	
	CC	33 (21,3)	24 (23,0)	7 (20,0)	0 (0,0)	17 (37,0)	
Alelos	T	132 (52,4)^{ab}	0,49^{a}	0,57^{ab}	0,77^{b}	0,50^{a}	0,036
	C	120 (47,6)	0,51	0,43	0,23	0,50	

Os valores de *p* foram calculados a partir de tabelas de contingência comparando os pacientes com DM2 de acordo com a presença e o grau de severidade da ND. n= número de indivíduos (%).

TABELA 5 – Frequências haplotípicas dos polimorfismos no gene do TGFβ1 nos pacientes com DM2 de acordo com a presença da retinopatia ou nefropatia diabética

Haplótipos	Sem RD, n (%)	Com RD, n (%)	p*	Sem ND, n (%)	Com ND,n (%)	p*
n	232	394		274	342	
-509C/869T	55,5	55,5	0,805	34,3	39,6	0,497
-509C/869C	6,1	7,4		1,5	1,8	
-509T/869T	2,2	1,4		5,9	6,9	
-509T/869C	36,2	35,7		58,3	51,7	

Os valores de *p* foram calculados a partir de um teste de permutação comparando pacientes com RD ou ND e pacientes sem RD ou ND, respectivamente (programa PHASE 2.1). *n* = número de cromossomos.

diferiram significativamente daquelas observadas nos pacientes sem essa complicação.

Entretanto, quando levou-se em consideração a gravidade da disfunção renal, comparando-se as frequências genotípicas e alélicas de ambos os polimorfismos nos diferentes grupos de pacientes (normo, micro, macroalbuminúria, diálise e DRC), observou-se que o alelo 869C foi menos frequente entre os pacientes com DRC, sendo que nenhum homozigoto para o alelo C foi encontrado neste grupo (Tabela 4).

Por outro lado, foi observado um aumento na frequência de homozigotos para o alelo 869C entre os pacientes dialíticos quando comparados aos pacientes normoalbuminúricos (Tabelas 4). Em um modelo recessivo, o alelo C pareceu se constituir em um fator associado ao risco aumentado de progressão para a diálise.

Quando comparamos as frequências haplotípicas dos polimorfismos no gene do TGFβ1 entre os pacientes com DM2 e os doadores do banco de sangue, não observamos diferenças estatisticamente significativas, sendo que o haplótipo formado pelos alelos mais comuns correspondeu a aproximadamente 50% dos cromossomos. As estimativas do desequilíbrio de ligação (D' e r^2) indicaram que ambos os polimorfismos estão ligados de forma moderada (D' = 0,87 e r^2 = 0,53 entre os doadores do banco de sangue e D' = 0,93 e r^2 = 0,67 entre os pacientes com DM2).

As frequências haplotípicas estimadas para os pacientes com RD e ND foram semelhantes àquelas calculadas para os pacientes sem essas complicações (Tabela 5). Da mesma forma, quando levamos em consideração a gravidade da RD e da ND, comparando-se a frequência dos haplótipos entre os diferentes grupos de pacientes, também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (dados não demonstrados; p > 0,05 para todas as comparações).

DISCUSSÃO

O TGFβ1 é uma citocina multifuncional que regula a proliferação, diferenciação, formação da matriz extracelular e outras funções em vários tipos celulares. Esta citocina está diretamente envolvida no desenvolvimento de complicações microvasculares nos pacientes com DM2 (21, 22). No presente estudo, foi analisada a associação de dois SNPs no gene do TGFβ1 (-509C>T - rs1800469 e 869T>C - rs1800470) com o desenvolvimento e a severidade da RD e da ND.

Em relação à RD, as frequências alélicas e genotípicas obtidas para os polimorfismos -509C>T e 869T>C não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos de pacientes avaliados (sem RD, RDNP e RDP). Esse resultado vai ao encontro do estudo de Buraczynska et al. (2007), que também não observaram relação do polimorfismo -509C>T com a RD em um estudo que incluiu poloneses com DM2. Dados similares foram observados por Beránek et al. (2002), no qual também não foi encontrada associação do SNP -509C>T com a RD proliferativa em tchecos com DM2.

Entretanto, em relação ao polimorfismo 869T>C, Buraczynska et al. (2007) mostraram uma forte associação do alelo C com o desenvolvimento da RD nos poloneses com DM2. Beránek et al. (2002) também encontraram associação desta variante com a RDP em tchecos com DM2; porém, o genótipo de risco foi o TT. Esses resultados discrepantes são difíceis de serem analisados no contexto das evidências disponíveis sobre a funcionalidade do polimorfismo 869T>C. Foi demonstrado em modelos murinos que o TGFβ1 é necessário para a manutenção da integridade e da funcionalidade da barreira hematorretiniana, para a sobrevivência das células endoteliais e para a homeostasia da microvasculatura da retina em adultos (22).

Assim, seria plausível especular se os pacientes com DM2, homozigotos para o alelo T, produzem TGFβ1 em uma proporção menor do que a necessária para manter a função e a estrutura retinianas que, na presença de outros fatores de risco, os tornam mais suscetíveis a desenvolver ou agravar a RD, o que explicaria os resultados observados por Beránek et al. (2002). Por outro lado, a maior produção de TGFβ1 resultante da presença do alelo C nessa posição (39,40) levaria ao desenvolvimento de complicações fibróticas, o que explicaria os achados observados por Buraczynska et al. (2007). Além disso, alguns estudos *in vitro* (26) e *in vivo* (41) não demonstraram qualquer relação entre o polimorfismo 869T>C e a produção de TGFβ1.

Considerando a hipótese de que estes polimorfismos pudessem ter um efeito significativo no desenvolvimento e/ou na progressão da RD, calculamos o poder estatístico do nosso estudo para demonstrar tal relação. Para o polimorfismo -509C>T, houve um poder de 80% para detectar uma razão de chances (RC) = 1,75 considerando o genótipo TT como o fator de risco para essa complicação. Da mesma forma, o presente estudo teve 80% de poder para detectar uma RC = 2,0 para o genótipo TT como fator associado ao risco aumentado de RD proliferativa. E, em relação ao polimorfismo 869T>C, esse estudo também teria um poder de aproximadamente 80% para detectar uma RC = 2,0 considerando o genótipo CC como fator de risco para a RD, e uma RC = 2,2 considerando o genótipo TT como fator de risco para a RD proliferativa.

Quando avaliamos a presença e a progressão da ND, constatamos que o polimorfismo -509C>T não apresentou qualquer associação com a disfunção renal, assim como já havia sido demonstrado por Buraczynska et al. (2007) e Prasad et al. (2007) para uma amostra de poloneses e indianos com DM2, respectivamente. Em relação ao polimorfismo 869T>C no gene do TGFβ1,

não encontramos evidências de que esse polimorfismo estivesse associado à presença da ND, o que corrobora estudos prévios em japoneses (42) e indianos (43) com DM2. Entretanto, resultados completamente opostos foram obtidos em chineses, alemães e poloneses com DM2. Em chineses (44) e poloneses (30), observou-se que o alelo C estava associado com o risco aumentado de ND, ao passo que em alemães foi demonstrado que o genótipo TT estava associado com o aumento no risco para essa complicação (45). O presente estudo teve um poder estatístico de 80% de detectar uma RC = 1,75 considerando o genótipo TT (polimorfismo -509C > T) como fator de risco para a ND. Quanto ao polimorfismo 869T > C, obtivemos um poder superior a 80% para detectar uma RC = 2,0, considerando tanto o genótipo CC como o genótipo TT como fator de risco para essa complicação.

Neste estudo, porém, o genótipo CC foi mais frequente entre os pacientes dialíticos do que entre os normoalbuminúricos, enquanto o alelo C foi menos prevalente entre os pacientes com DRC não tratados com diálise em comparação aos pacientes com normoalbuminúria, o que sugere uma influência do polimorfismo 869T > C na progressão da ND. A aparente discrepância na observação de que houve um aumento na proporção de homozigotos para o alelo C entre os pacientes com DRC tratada com diálise ao mesmo tempo em que houve a ausência de homozigotos para esse mesmo alelo entre os pacientes com DRC não tratada com diálise indica que o alelo C pode, de fato, estar implicado no pior prognóstico da disfunção renal, estando associado ao risco aumentado de disfunção renal avançada. Esses dados estão de acordo com o que foi observado previamente em caucasianos do norte da Europa (46), holandeses (47) e em indianos (48) sem DM2. Um estudo posterior também demonstrou uma associação do alelo C com a disfunção renal em homens chineses não-diabéticos. Porém, não foi identificada qualquer relação entre o polimorfismo 869T > C e a disfunção renal entre as mulheres (49).

Considerando essas evidências, é plausível supor que o alelo C, quando em homozigose, aumente o risco de progressão para a DRC avançada que, quando não tratada com diálise, aumenta consideravelmente o risco de mortalidade. Essa hipótese é corroborada por estudos in *vitro* (40) e em humanos (39) que demonstraram que o alelo C aumenta a expressão do gene do TGFβ1, promovendo então, a hipertrofia renal e o acúmulo de matriz extracelular que, por sua vez, resultam nas anormalidades estruturais e funcionais características da ND (21).

Porém, cabe ressaltar que algumas limitações deste estudo devem ser consideradas em relação aos resultados relatados acima. Primeiro, como os dois grupos amostrais compostos por indivíduos com DRC (tratados ou não com diálise) foram extremamente reduzidos, é possível que as diferenças observadas sejam devido ao acaso. Dessa forma, a perspectiva de continuidade deste estudo é aumentar o tamanho amostral destes dois grupos de pacientes, principalmente dos indivíduos com DRC não tratados com diálise, para verificar se os resultados obtidos no presente estudo são espúrios ou se realmente existe uma relação entre o polimorfismo 869T > C e a progressão para a disfunção renal avançada em pacientes com DM2. Como pôde ser observado nas tabelas de resultados, aproximadamente metade das amostras disponíveis foram genotipadas para o polimorfismo 869T > C em comparação ao polimorfismo -509C > T, devido a razões técnicas pertinentes ao protocolo de genotipagem.

Além disso, como o presente estudo é um estudo do tipo caso-controle, não podemos avaliar se a ausência de homozigotos para o alelo C entre os pacientes com DRC não tratados com diálise ocorreu devido a um possível efeito protetor desse alelo ou se os pacientes com esse genótipo não foram incluídos no estudo, por alguma razão não identificada. Somente um estudo prospectivo, que acompanhe os pacientes desde o momento de seu ingresso na hemodiálise, poderá avaliar a evolução dos indivíduos portadores de diferentes genótipos, a fim de elucidar se o genótipo CC (polimorfismo 869T > C) confere proteção ou risco para o desenvolvimento de complicações graves nos pacientes com DM2.

Outra limitação que deve ser considerada é o fato de que o DM2 e suas complicações microvasculares – mais especificamente a RD e a ND – são doenças multifatoriais que resultam de uma interação entre diversos fatores genéticos e ambientais (18, 19, 13), o que poderia explicar, ao menos em parte, a discrepância observada nos diferentes estudos. Assim, uma análise mais detalhada deve incluir no modelo as várias características clínicas e metabólicas que potencialmente podem modificar a relação entre os polimorfismos –509C > T e 869T > C e suas complicações, como o sexo, a idade, a obesidade e o fumo, por exemplo.

Os estudos epidemiológicos e os modelos matemáticos têm demonstrado que a análise de haplótipos pode fornecer evidências mais consistentes sobre a associação de uma determinada região do genoma com o fenótipo clínico de interesse do que as análises individualizadas dos marcadores, já que os haplótipos geralmente são mais informativos (devido a maior heterozigosidade) do que cada um dos SNPs isoladamente (50,51,52). Berânek et al. (2002) observaram que o haplótipo -509T/869C foi mais frequente nos pacientes com RD proliferativa do que nos pacientes sem RD proliferativa na população tcheca, enquanto o mesmo haplótipo estava associado com o aumento no risco de desenvolvimento e progressão da DRC entre os caucasianos do Reino Unido (46). No presente estudo também avaliamos a relação dos haplótipos formados pelas variantes -509C > T e 869T > C no gene do TGFβ1 com a presença e a gravidade da RD e da ND. No entanto, as frequências haplotípicas foram similares entre os diferentes grupos de pacientes.

CONCLUSÕES

Apesar das evidências experimentais que sugerem a relação dos polimorfismos no gene do TGFβ1 com o DM2 e suas complicações crônicas em populações caucasianas, não fomos capazes de identificar uma associação dos polimorfismos -509C > T e 869T > C com a RD e/ou sua gravidade. Como apenas dois estudos além do nosso analisaram a associação entre esses polimorfismos e a RD, com resultados muito contrastantes, novos estudos são necessários para definir o papel desses dois polimorfismos na patogênese da RD.

Embora o polimorfismo 869T > C pareça não estar associado com a ocorrência da ND, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que essa variante está envolvida na progressão da ND, mais especificamente, na disfunção renal avançada. Quanto ao polimorfismo -509C > T, não detectamos qualquer relação entre essa variante e a ND. Considerando que poucos estudos foram realizados com o objetivo de investigar o papel das variantes -509C > T e 869T > C no gene do TGFβ1 na disfunção renal em pacientes com DM2, ainda não se pode definir o efeito destes polimorfismos na patogênese das complicações microvasculares do DM2, sendo que outras análises são necessárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Patel S, Chen H, Tinkham NH, Zhang K. Genetic susceptibility of diabetic retinopathy. Current Diab Rep. 2008;8:257-262.
2. Kramer CK, Leitão CB, Pinto LC, Bolson P, Boza J, Silveiro SP, Gross JL, Canani LH. Risk factors for micro and macrovascular disease in Black and White patients with type 2 diabetes mellitus. Rev Assoc Med Bras. 2009;55:308-312.
3. He Z, King GL. Microvascular complications of diabetes. Endocrinol Metab Clin North Am. 2004;33:215-238.
4. Esteves J, Laranjeira AF, Roggia MF, Dalpizol M, Scocco C, Kramer CK, Azevedo MJ, Canani LH. Fatores de risco para retinopatia diabética. Arq Bras Endocrinol Metab. 2008;52:431-441.
5. Zelmanovitz T, Gerchman F, Balthazar APS, Thomazelli FCS, Matos JD, Canani LH. Diabetic nephropathy. Diabetol Metab Syndr. 2009;1: 10. doi: 10.1186/1758-5996-1-10.
6. Nascimento OJM. Neuropatia diabética: diagnóstico e tratamento. In: Oliveira JEP e Milech A (Eds.). Diabetes Mellitus: clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar. São Paulo, Atheneu; 2004. p. 183-197.
7. Shah R, Hurley CK, Posch PE. A molecular mechanism for the differential regulation of TGF-beta-1 expression due to the common SNP -509C-T (c.-1347C-T). Hum Genet. 2006;120:461-469.
8. Kanski JJ. Oftalmologia Clínica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. Cap. 16 Doença vascular da retina, p. 565-623.
9. Serrarbassa PD, Dias AFG, Vieira MF. Novos conceitos em retinopatia diabética: dano neurológico versus dano vascular. Arq Bras Oftalmol. 2008;71:459-463.
10. Santos KG, Tschiedel B, Schneider JR, Souto KEP, Roisenberg I. 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. 2005;38:221-225.
11. Agardh E, Agardh CD. Diabetic retinopathy. In: De Fronzo RA, Ferrannini E, Keen H e Zimmet P. (Eds.). International Textbook of Diabetes Mellitus. 3ª ed. Chichester: John Wiley & Sons; 2008, p. 1187-1206.
12. Liew G, Klein R, Wong TY. The role of genetics in susceptibility to diabetic retinopathy. Int Ophtalmol Clin. 2009;49:35-52.
13. Ng DP. Human genetics of diabetic retinopathy: current perspectives. J Ophthalmol. (2010;pii:172593.
14. Scheffel RS, Bortolanza D, Weber CS, Costa LA, Canani LH, Santos KG, Crispim D, Roisenberg I, Lisboa HR, Tres GS, Tschiedel B, Gross JL. 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. 2004;50:263-267.
15. Gross JL, Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. Diabetes Care. 2005;28:176-188.
16. American Diabetes Association. Nephropathy in diabetes. Diabetes Care. 2004;27:S79-S83.
17. Gouvêa WL. Nefropatia diabética. In: Oliveira JEP e Milech A. (Eds.). Diabetes Mellitus: clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar. São Paulo: Atheneu; 2004, p. 167-181.
18. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2010;33:S62-S69.
19. Carpena MP, Rados DV, Sortica DA, Souza BM, Reis AF, Canani LH, Crispim D. Genetics of diabetic nephropathy. Arq Bras Endocrinol Metab. 2010;54:253-261.
20. Sampaio E, Almeida HGG, Delfino VDA. Nefropatia e retinopatia em diabéticos do tipo 1 de um programa de atendimento multiprofissional universitário. Arq Bras Endocrinol Metab. 2007;51:410-418.
21. Reeves WB, Andreoli TE. Transforming growth factor beta contributes to progressive diabetic nephropathy. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:7667-7669.
22. Walshe TE, Sant-Geniez M, Maharaj ASR, Sekiyama E, Maldonado AE, D'Amore PA. TGF-β is required for vascular barrier function, endothelial survival and homeostasis of the adult microvasculature. PLoS One. 2009;4:e5149.doi: 10.1371/journal.pone.0005149.
23. Fujii D, Brissenden JE, Derynck R, Francke U. Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. Somat Cell Mol Genet. 1986;12:281-288.
24. Derynck R, Rhee L, Chen EY, van Tilburg A. Intron-exon structure of the human transforming growth factor-beta precursor gene. Nucleic Acids Res. 1987;15:3188-3189.
25. Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Générénaz L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Poirier O. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de lInfarctus du Myocarde (ECTIM) Study. Hypertension. 1996;28:881-887.
26. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-□1 gene: association with transforming growth factor-□1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. Transplantation. 1998;66:1014-1020.
27. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta-1. Hum Mol Genet. 1999;8:93-97.
28. Lario S, Iñigo P, Campistol JM, Poch E, Rivera F, Oppenheimer F. Restriction enzyme-based method for transforming growth factor-beta(1) genotyping: nonisotopic detection of polymorphisms in codons 10 and 25 and the 5-flanking region. Clin Chem. 1999;45:1290-1292.
29. Beránek M, Kanková K, Benes P, Izakovicová-Hollá L, Znojil V, Hájek D, Vlková E, Vácha J. Polymorphism R25P in the gene encoding transforming growth factor-beta (TGF-beta1) is a newly identified risk factor for proliferative diabetic retinopathy. Am J Med Genet. 2002;109:278-283.
30. Buraczynska M, Baranowicz-Gaszczyk I, Borowicz E, Ksiazek A. TGF-beta1 and TSC-22 gene polymorphisms and susceptibility to microvascular complications in type 2 diabetes. Nephron Physiol. 2007;106:69-75.
31. Prasad P, Tiwari AK, Kumar KMP, Ammini AC, Gupta A, Gupta R, Thelma BK. Association of TGFβ1, TNFβ, CCR2 and CCR5 gene polymorphisms in type-2 diabetes and renal insufficiency among Asian Indians. BMC Med Genet. 2007;8:20. doi: 10.1186/1471-2350-8-20.

32. Canani LH, Capp C, Ng DPK, Choo SGL, Maia AL, Nabinger GB, Santos K, Crispim D, Roisenberg I, Krolewski AS, Gross JL. The fatty acid-binding protein-2 A54T polymorphism is associated with renal disease in patients with type 2 diabetes. Diabetes. 2005;54:3326-3330.
33. Crispim D, Fagundes NJR, Santos KG, Rheinheimer J, Bouças AP, Souza BM, Macedo GS, Leiria LB, Gross JL, Canani LH. Polymorphisms of the UCP2 gene are associated with proliferative diabetic retinopathy in patients with diabetes mellitus. Clin Endocrinol. 2010;72:612-619.
34. Lahiri DK. e Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Res. 1991;19:5444.
35. Abramson HJ, Gahlinger MP. Computer programs for epidemiologic analyses: PEPI. Version 4.0. Salt Lake City: Sagebrush Press; 2002.
36. Hedrick PW. Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. Genetics. 1987;17:331-341.
37. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. Am J Hum Genet. 2001a;68:978-989.
38. Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. Am J Hum Genet. 2005;76:449-462.
39. Yokota M, Ichihara S, Lin TL, Nakashima N, Yamada Y. Association of a T29-->C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. Circulation. 2000;101:2783-2787.
40. Dunning AM, Ellis PD, McBride S, Kirschenlohr HL et al. A transforming growth factor beta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. Cancer Res. 2003;63:2610-2615.
41. Dell`Omo G, Penno G, Picci L, Lucchesi D, Del Prato S, Pedrinelli R. Lack of association between TGF-β-1 genotypes and microalbuminuria in essential hypertensive men. Nephrol Dial Transplant. 2009;24:1864-1869.
42. Akai Y, Sato H, Ozaki H, Iwano M, Dohi Y, Kanauchi M. Association of transforming growth factor-beta1 T29C polymorphism with the progression of diabetic nephropathy. Am J Kidney Dis. 2001;38:S182-S185.
43. Ahluwalia TS, Khullar M, Ahuja M, Kohli HS, Bhansali A, Mohan V, Venkatesan R, Rai TS, Sud K, Singal PK. Common variants of inflammatory cytokine genes are associated with risk of nephropathy in type 2 diabetes among Asian Indians. PLoS One. 2009;4:e5168. doi: 10.371/journal.pone.0005168.
44. Wong TY, Poon P, Chow KM, Szeto CC, Cheung MK, Li PK. Association of transforming growth factor-beta (TGF-beta) T869C (Leu10Pro) gene polymorphisms with type 2 diabetic nephropathy in Chinese. Kidney Int. 2003;63:1831-1835.
45. Babel N, Gabdrakhmanova L, Hammer MH, Schoenemann C, Skrypnikov V, Poliak N, Volk HD, Reinke P. Predictive value of cytokine gene polymorphisms for the development of end--stage renal disease. J Nephrol. 2006;19: 802-807.
46. Khalil M.S., El Nahas A.M., Blakemore A.I.F. Transforming growth factor-β1 SNPs: genetic and phenotypic correlations in progressive kidney insufficiency. Nephron Exp Nephrol (2005) 101: e31-e41.
47. van de Wetering J, Weimar CH, Balk AH, Roodnat JI, Holweg CT, Baan CC, van Domburg RT, Weimar W. The impact of transforming growth factor-beta1 gene polymorphism on end--stage renal failure after heart transplantation. Transplantation. 2006;82:1744-1748.
48. Mittal RD, Manchanda PK. Is low-frequency distribution of TGF-beta genotype associated with increased risk for end-stage renal disease? DNA Cell Biol. 2007;26:172-177.
49. Hu BC, Chu SL, Wang GL, Gao PJ, Zhu DL, Wang JG. Association between genetic variation in transforming growth factor β1 and β3 and renal dysfunction in non-diabetic Chinese. Clin Exp Hypertens. 2008;30:121-131.
50. Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J et al. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. Science. 2001b;293:489-493.
51. Zhao H, Pfeiffer R, Gail MH. Haplotype analysis in population genetics and association studies. Pharmacogenomics. 2003;4:171-178.
52. Zintzaras E, Lau J. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. J Clin Epidemiol. 2008;61:634-645.

✉ Endereço para correspondência
Michel Broilo Manica
Rua Costa, 30/206
90.110-270 – Porto Alegre, RS – Brasil
☎ (51) 3230-2704
💻 mibm@ig.com.br

Recebido: 24/4/2012 – Aprovado: 26/7/2012