

PPGAAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ASSISTÊNCIA E AVALIAÇÃO EM SAÚDE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ASSISTÊNCIA E AVALIAÇÃO
EM SAÚDE

O polimorfismo I/D do gene *ECA* e nefropatia diabética: evidências baseadas em meta-análises

LUCIANA CARVALHO SILVEIRA

Goiânia

2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:


Nome completo do autor: Luciana Carvalho Silveira

Título do trabalho: O polimorfismo I/D do gene *ECA* e nefropatia diabética: evidências baseadas em meta-análises

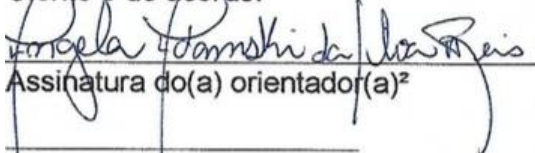
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 30/ 06 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

PPGAAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ASSISTÊNCIA E AVALIAÇÃO EM SAÚDE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ASSISTÊNCIA E AVALIAÇÃO
EM SAÚDE**

**O polimorfismo I/D do gene *ECA* e nefropatia diabética: evidências
baseadas em meta-análises**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Assistência e Avaliação em Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre em Assistência e Avaliação em Saúde.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Angela Adamski da Silva Reis

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Santos

Goiânia

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silveira, Luciana Carvalho

O polimorfismo I/D do gene ECA e nefropatia diabética: evidências baseadas em em meta-análises [manuscrito] / Luciana Carvalho Silveira, Angela Adamski da Silva Reis, Rodrigo da Silva Santos. - 2018.

LXIV, 64 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Angela Adamski da Silva Reis; co-orientador Dr. Rodrigo da Silva Santos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Assistência e Avaliação em Saúde, Goiânia, 2018.

Bibliografia. Anexos.

Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Polimorfismo genético. 2. Gene ECA. 3. Nefropatia diabética. I. Reis, Angela Adamski da Silva. II. Santos, Rodrigo da Silva. III. Reis, Angela Adamski da Silva, orient. IV. Santos, Rodrigo da Silva, co orient. V. Título.

CDU 575



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 28

Aos quatro dias do mês de junho do ano de 2018, às 03h:00 min no Mini Auditório da Faculdade de Farmácia da UFG, realizou-se a Defesa de dissertação, intitulada **“O polimorfismo I/D do gene ECA e nefropatia diabética: evidências baseadas em meta-análises”**, de autoria de Luciana Carvalho Silveira, aluna do Programa de Pós-Graduação em Assistência e Avaliação em Saúde, nível: Mestrado. A Comissão Examinadora esteve constituída pelos professores Angela Adamski da Silva, Rodrigo da Silva Santos, Walmirton Bezerra D'alessandro, Yves Mauro Fernandes Ternes, Aline Helena da Silva Cruz e Erikson Custódio Alcântara. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, cada avaliador emitiu um parecer sobre o desempenho da candidata, sendo a mesma *Aprovada* pela Comissão Examinadora. Cumpridas as formalidades de pauta, às 10h:40 min a presidência da mesa encerrou a sessão e para constar, eu, *ANGELA ADAMSKI DA SILVA*, lavrei a presente Ata que, depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da banca examinadora e pelo discente.

Parecer da Comissão Examinadora

Membro	Aprovado/ Reprovado
Angela Adamski da Silva	<i>Aprovada</i>
Rodrigo da Silva Santos	<i>Aprovada</i>
Yves Mauro Fernandes Ternes	<i>Aprovada</i>
Erikson Custódio Alcântara	<i>Aprovada</i>
Walmirton Bezerra D'Alessandro	
Aline Helena da Silva Cruz	


Goiânia, 04/06/2018 de 2018


Prof. Dr.ª Angela Adamski da Silva


Presidente


Prof. Dr. Yves Mauro F. Ternes

Membro Titular


Prof. Erikson Custódio Alcântara

Membro Titular


Prof. Dr. Rodrigo da Silva Santos

Membro Titular


Luciana Carvalho Silveira

Discente

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

Nome: SILVEIRA, Luciana Carvalho

Título: O polimorfismo I/D do gene *ECA* e nefropatia diabética: evidências baseadas em meta-análises

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Assistência e Avaliação em Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre em Assistência e Avaliação em Saúde.

Aprovado em: 04/06/2018

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Angela Adamski da Silva Reis
Universidade Federal de Goiás - UFG

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Santos
Universidade Federal de Goiás - UFG

Examinador: Prof. Dr. Yves Mauro Fernandes Ternes
Universidade Federal de Goiás - UFG

Examinador: Prof. Dr. Erikson Custódio Alcântara
Universidade Estadual de Goiás - UEG

Ou

Suplente: Prof. Dr. Walmirton Bezerra D'Alessandro
Universidade Federal de Goiás - UFG

Suplente: Profa. Dra. Aline Helena da Silva Cruz
Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade Araguaia, Goiás.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar meus passos e me dar forças para a realização dos meus sonhos;

À minha família, que não mede esforços para me apoiar incondicionalmente, todo meu amor, respeito e carinho por vocês que são o meu porto seguro;

Ao meu namorado, pelo seu companheirismo, sua compreensão nos momentos de ausência e sua alegria motivacional;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rodrigo da Silva Santos, minha gratidão por ter viabilizado a concretização deste mestrado e por ter me acompanhado em todos os momentos;

À minha orientadora, Profa. Dra. Angela Adamski da Silva Reis, por ter me aceitado e proporcionado todo o suporte nesta jornada;

À Dra. Débora Rodrigues, minhas amigas da equipe de Fisioterapia e Enfermagem da Santa Casa, que torceram e estiveram me apoiando neste projeto;

Aos meus colegas Vítor e Ronney que sempre me incentivaram, ajudaram, aconselharam, na finalização deste estudo;

Às minhas colegas de laboratório, Elisângela e Laura, pela grande colaboração nesta pesquisa;

À equipe do Laboratório de Patologia Molecular, pela acolhida e todo crescimento intelectual proporcionado por uma equipe multiprofissional;

À todos que sempre acreditaram e tiveram uma palavra de incentivo e apoio.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Diabetes <i>Mellitus</i>	14
1.2 Diabetes <i>Mellitus</i> do tipo 2.....	17
1.3 Nefropatia Diabética.....	20
1.4 O Eixo Renina-Angiotensina-Aldosterona e Diabetes.....	22
1.5 O polimorfismo do gene <i>ECA</i>	23
1.6 Saúde Baseada em Evidências.....	26
2 JUSTIFICATIVA.....	28
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4 MÉTODOS.....	30
4.1 Revisão sistemática de etiologia e risco.....	30
4.2 Protocolo de Registro.....	30
4.3 Seleção de estudos.....	31
4.4 Avaliação da qualidade metodológica.....	34

4.5 Extração de dados.....	34
4.6 Análise de dados e técnicas estatísticas.....	34
5 RESULTADOS.....	38
6 DISCUSSÃO.....	45
7 CONCLUSÃO.....	48
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação Etiológica do DM.....	15
Tabela 2. Critérios diagnósticos para DM recomendados pela ADA e pela SBD (2017)..	17
Tabela 3. Classificação KDIGO (2012) de nomenclatura e valores de correspondência da albuminúria, para detecção da DRD.	21
Tabela 4. Valores de excreção urinária de albumina e taxa de filtração glomerular (2014).	32
Tabela 5. Comparação das características clínicas estudada entre os grupos caso (com ND) e controle (sem ND).....	39
Tabela 6. Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o Polimorfismo ACE nos grupos Caso e Controle.	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Qualidade metodológica para inclusão dos estudos	36
Quadro 2. Características dos estudos incluídos.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A relação do <i>stress</i> oxidativo, resistência à insulina, o Diabetes <i>Mellitus</i> e as doenças cardiovasculares pela hipótese “solo comum”.....	18
Figura 2. Localização Citogenética: 17q23.3 do polimorfismo I/D do gene <i>ECA</i>	24
Figura 3. Fluxograma PRISMA de pesquisa e processo de inclusão dos estudos.	33
Figura 4. <i>Forest-plot</i> para o genótipo I/D	41
Figura 5. <i>Funnel-plot</i> para o genótipo I/D.....	42
Figura 6. <i>Forest-plot</i> para o genótipo D/D.....	43
Figura 7. <i>Funnel-plot</i> para o genótipo D/D.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DM	Diabetes Mellitus
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRC	Doença Renal Crônica
DRD	Doença Renal do Diabetes
EUA	Excreção Urinária de Albumina
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
HbA1c	Hemoglobina glicada
IC	Intervalo de Confiança
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IDDM	Diabetes <i>mellitus</i> insulino-dependente
IFT	<i>International Diabetes Federation</i>
JBI	<i>Joanna Briggs Institute</i>
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
LPM	Laboratório de Patologia Molecular
NIDDM	Diabetes <i>mellitus</i> insulino não-dependente
NHS	<i>National Institute for Health Research</i>
ND	Nefropatia Diabética
OR	<i>Odds ratio</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão Arterial

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PRISMA	Principais Itens para Relatar Revisões Sistemáticas e Meta-análises
PROSPERO	<i>International prospective register of systematic reviews</i>
PNS	Programa Nacional de Saúde
RAAS	<i>Renin-Angiotensin-Aldosterone System</i>
SUMARI	Sistema de Gestão Unificada, Avaliação e Revisão de Informações
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
TDG	Tolerância diminuída a glicose
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
UFG	Universidade Federal de Goiás
UY	<i>University of York</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

A Nefropatia Diabética (ND) é uma complicação microvascular renal do Diabetes *Mellitus* (DM), caracterizada pelo aumento da albuminúria e perda progressiva da função renal. Nos últimos 10 anos, observa-se uma incidência cumulativa de 40%, principalmente em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) sendo uma causa importante de morbimortalidade. O polimorfismo Inserção / Deleção (I/D) no gene *ECA* poderia influenciar a predisposição para ND por modulação vascular no rim, através de um efeito direto sobre a hipertrofia celular, influenciando a proliferação e a ruptura da matriz extracelular. Estudos mostram discordância, fato que aumenta a necessidade de análises conjuntas para que se possam gerar conclusões seguras. O objetivo do estudo foi investigar a associação entre o polimorfismo I/D do gene *ECA* e o desenvolvimento de ND em pacientes com DM2. Através de um protocolo de pesquisa padronizado, realizou-se a busca bibliográfica nos bancos de dados eletrônicos PubMed e Cochrane Library de 1995-2017, selecionando estudos observacionais do tipo caso-controle, usando os termos "polymorphism" AND "ACE gene" AND "diabetic nephropathy". Foram incluídos 33 estudos na síntese qualitativa e 30 estudos na meta-análise, sendo 9.077 participantes com DM2 genotipados, 4.774 (52, 6%) indivíduos com ND e 4.303 (47,4%) indivíduos sem ND. Avaliados separadamente, os genótipos para o grupo caso, temos I/I (23, 5%), I/D (45, 8%) e D/D (30, 6%). Os genótipos para o grupo controle, I/I (28, 6%), I/D (46,4%) e D/D (25%). A maior prevalência observada é do genótipo I/D em ambos os grupos. Nas frequências alélicas calculadas através do Teste de Hardy-Weinberg, o alelo D mutante apresenta-se com 53% no grupo caso e 48% no grupo controle. O alelo I selvagem presente em 47% no grupo caso e 52% no grupo controle. A presente meta-análise conclui que o polimorfismo I/D do gene *ECA* estudado através dos genótipos I/D e D/D não estão associados ao risco de desenvolvimento da ND em indivíduos com DM2, porém, a presença do alelo D tem frequência importante no risco de desenvolvimento da doença, assim como o papel protetivo do alelo I.

Palavras-chave: “Polimorfismo genético”, “gene *ECA*” e “Nefropatia diabética”.

ABSTRACT

Diabetic Nephropathy (DN) is a microvascular renal complication of Diabetes *Mellitus* (DM), characterized by increased albuminuria and progressive loss of renal function. A cumulative incidence of ND in the last 10 years was observed in 40%, mainly in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM), being an important cause of morbidity and mortality among these individuals. The Insertion / Deletion (I/D) polymorphism in the *ACE* gene could influence the predisposition to DN by vascular modulation in the kidney, through a direct effect on the cellular hypertrophy, influencing the proliferation and the rupture of the extracellular matrix. Many studies about this subject are discordant, a fact that increases the need for joint analysis so that safe conclusions can be generated. The aim of this study was to investigate the association between *ACE* gene I/D polymorphism and the development of DN in patients with T2DM. Through a standardized research protocol, the bibliographic search was performed in the PubMed and Cochrane Library electronic databases of 1995-2017, selecting case-control observational studies using the terms "polymorphism" AND " *ACE* gene" AND "diabetic nephropathy ". We included 33 studies in qualitative synthesis and 30 studies for meta-analysis, with 9.077 participants with T2DM genotyped, 4.774 (52, 6%) individuals with DN and 4.303 (47. 4%) individuals without DN. Evaluated separately, the genotypes for the case group, we have I/I (23, 5%), I/D (46, 4%) and D/D (30, 6%). The genotypes for the control group, I/I (28, 6%), I/D (46.19%) and D/D (25%). The highest prevalence observed was of the I/D genotype in both groups. In the allele frequencies calculated by the Hardy-Weinberg Test, the mutant D allele presents with 54% in the case group and 48% in the control group. The wild-type I allele was present in 46% in the case group and 52% in the control group. The present meta-analysis concludes the I/D polymorphism of the *ACE* gene studied through the I/D and D/D genotypes is not associated with the risk of developing DN in individuals with T2DM, but the presence of the D allele has significant significance in the risk of developing the disease, as well as the protective role of the I allele.

Keywords: "polymorphism"; "*ACE* gene", "diabetic nephropathy".

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus

O Diabetes *Mellitus* (DM) consiste em um distúrbio metabólico caracterizado por um quadro de elevados níveis de glicose no sangue (hiperglicemia) persistente^{1,2}. A glicose constitui a principal fonte de energia para os organismos vivos, em virtude da sua participação em importantes vias metabólicas através de um hormônio produzido pelo pâncreas, a insulina³. Esse hormônio, diante da presença de glicose no meio extracelular, se liga a receptores de insulina, localizados na superfície das células. Essa interação insulina - receptor de insulina, promove a abertura de canais especializados que permitem, então, a passagem da glicose para o ambiente intracelular produzindo a energia necessária ao normal funcionamento de músculos e tecidos⁴.

A deficiência na produção de insulina, tanto em sua ação, quanto em ambos os mecanismos, acarreta na permanência da glicose no sangue. A persistência deste quadro de hiperglicemia propicia o desenvolvimento de complicações secundárias como doenças cardiovasculares, neuropatia, retinopatia e, principalmente, a nefropatia diabética^{5,6}.

Em 2015, a *International Diabetes Federation* (IDF) registrou 5 milhões de óbitos por complicações diabéticas em todo o mundo. Nesse período, os gastos médicos com tratamentos para diabetes chegaram a 673 bilhões de dólares, cerca de 12% do gasto total com a saúde⁷. Estatísticas mundiais mostram que o diabetes está associado a significantes taxas de morbidade, sendo considerado, uma das maiores emergências de saúde do século XXI⁸.

Atualmente, estima-se uma proporção de 1 diabético entre cada 11 adultos no mundo, representada através dos 415 milhões de adultos diagnosticados com diabetes. Além disso, 318 milhões de indivíduos apresentam graves alterações indicativas para essa patologia, em subdiagnóstico. A expectativa é de que, até 2040, esses registros alcancem a frequência de 642 milhões de diabéticos em todo o mundo⁸.

O Brasil aparece em quarto lugar no ranking mundial dos países com maior prevalência dessa doença (10,2%), cerca de 14.250.800 adultos brasileiros são diabéticos. Um brasileiro diabético apresenta um gasto médio anual de R\$ 5.345,90 com o seu tratamento e 500 novos casos são diagnosticados por dia⁹.

O Ministério da Saúde através da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) por inquérito domiciliar relatou a prevalência do diabetes de acordo com as grandes regiões nacionais, Unidades da Federação (UF) e capitais brasileiras. A região Centro-Oeste, apresentou-se como a segunda maior região do país com prevalência da doença, perdendo apenas para a região Sudeste. O estado de Goiás ficou em 8º lugar entre as UF, e Goiânia como a 3ª capital em prevalência de adultos diagnosticados com diabetes¹⁰.

O aumento da prevalência do DM está associado com diversos fatores: rápida urbanização, transição epidemiológica, hábitos alimentares, sedentarismo, sobrepeso, crescimento e envelhecimento populacional e também, maior expectativa de vida dos indivíduos com diabetes².

A *American Diabetes Association* (ADA) e Organização Mundial de Saúde (OMS) propõem e definem classificações para DM, baseados em sua etiologia^{1,11}, dividindo-o em quatro principais classes clínicas, expostos na Tabela 1. Os fatores causais dos principais tipos de DM ainda não são completamente conhecidos, no entanto, podemos citar os fatores genéticos, biológicos e ambientais.

Tabela 1. Classificação Etiológica do DM

TIPOS DE DM	
1	<ul style="list-style-type: none"> - Tipo 1A: deficiência de insulina por destruição autoimune das células β comprovada por exames laboratoriais - Tipo 1B: deficiência de insulina de natureza idiopática.
2	DM tipo 2: perda progressiva de secreção insulínica combinada com resistência a insulina
3	DM gestacional: hiperglicemia de graus variados diagnosticada durante a gestação, na ausência de critérios de DM prévio.
4	Outros tipos de diabetes:
	<ul style="list-style-type: none"> Monogênicos (MODY); - Diabetes neonatal; - Secundário a endocrinopatias; - Secundário a doenças do pâncreas exócrino; - Secundário a infecções; - Secundário a medicamentos; - Mutações genéticas.

MODY: *Maturity-Onset Diabetes of the Young*.

Fonte: adaptado de *American Diabetes Association*; 2017¹

Outras causas de DM incluem defeitos genéticos na ação da insulina, decorrentes de mutações no gene do receptor de insulina, e doenças do pâncreas exócrino, como pancreatite, trauma, pancreatectomia e carcinoma pancreático. Além disso, endocrinopatias com aumento de hormônios contrarreguladores da ação da insulina, entre os quais hormônio de crescimento, cortisol e glucagon, podem provocar DM. Diferentes medicamentos podem ser associados a alterações no metabolismo da glicose por meio de diminuição da secreção ou da ação da insulina. Os exemplos mais comuns são os glicocorticóides, o ácido nicotínico e os antipsicóticos atípicos².

Os sinais e sintomas clássicos de hiperglicemia consistem na micção frequente (poliúria), sede excessiva (polidipsia), cansaço (fadiga), feridas de cicatrização lenta, perda de peso, recorrente infecções, formigamento ou dormência nas mãos e pés (neuropatia), bem como visão embaçada (retinopatia)⁹. Os sintomas apresentam-se com menor frequência nos indivíduos com diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), sendo assintomáticos ou oligossintomáticos por longo período. Fato este, que dificulta o reconhecimento pelo paciente⁵, retarda o diagnóstico, e potencializa o desencadeamento de complicações micro e macrovasculares¹².

Tem-se observado um aumento no número de casos em que a abertura do quadro de DM2, tenha sido com a manifestação inicial da cetoacidose diabética¹³. O rastreamento para diagnóstico precoce tem grande importância para a saúde pública, com isso está diretamente ligada à possibilidade de diagnóstico e tratamento precoces em indivíduos assintomáticos¹⁴.

De acordo com os critérios definidos pela ADA (2017)¹⁵, o diagnóstico laboratorial do DM pode ser realizado por meio de glicemia de jejum, glicemia 2 horas após teste oral de tolerância a glicose (TOTG) e hemoglobina glicada (HbA1c). Não existem outros testes laboratoriais validados e recomendados para essa finalidade. Os valores adotados pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) para cada um desses parâmetros são os mesmos recomendados pela ADA e encontram-se descritos na Tabela 2².

Tabela 2. Critérios diagnósticos para DM recomendados pela ADA e pela SBD (2017).

Exame	Normal	Pré-diabetes	Diabetes
Glicemia de jejum (mg/dL)	< 100	100 a 125	≥ 126
Glicemia 2 horas após TOTG com 75 g de glicose (mg/dL)	<140	100 a 199	≥ 200
Hemoglobina glicada (%)	<5,7	5,7 a 6,4	≥ 6,5

TOTG: teste oral de tolerância à glicose.

Fonte: Adaptado *American Diabetes Association*¹⁵.

Os critérios diagnósticos passaram por diversas modificações, devido ao surgimento de novas evidências referentes a associação de valores cada vez menores de glicemia a risco de complicações vasculares^{16,17,18}. O acompanhamento do indivíduo diagnosticado deve seguir rigoroso protocolo através de multi-especialidades, para métodos eficientes de controle glicêmico, gerenciamento da perda de peso se necessário, atividade física, suspensão do tabagismo e principalmente a avaliação sistemática e o manejo das complicações crônicas do DM com redução dos fatores de risco cardiológicos e renais².

1.2 Diabetes *Mellitus* do tipo 2

Entre os principais tipos de diabetes, o DM2 é o mais comum. Representa 90 a 95% de todos os casos do mundo e, vem crescendo exponencialmente em países subdesenvolvidos⁹. Pode-se prever a carga financeira que isso representará nos próximos anos para os sistemas de saúde em todos os países. E para os países em desenvolvimento econômico, que ainda enfrentam desafios no controle de doenças infecciosas, o impacto será ainda maior¹⁹.

O DM2 possui etiologia complexa e multifatorial, envolvendo componentes genético e ambiental^{1,11}. Geralmente, acomete indivíduos a partir dos quarenta anos, embora se descreva, aumento na sua incidência em crianças e jovens²⁰. Estudo recente em estados americanos encontrou aumento significativo da prevalência de DM2 em jovens, de 7% ao ano no século XXI²¹, sendo responsável por 10 a 50% dos casos de diabetes juvenil de início recente²².

O DM2 trata-se de uma doença poligênica, com forte herança familiar, ainda não completamente esclarecida, cuja ocorrência tem contribuição significativa de fatores ambientais. Acompanha o processo de urbanização crescente associado à adoção de estilos de vida pouco saudáveis. Os hábitos alimentares inadequados e inatividade física contribuem para a obesidade e destacam-se como um dos seus principais fatores de risco^{1,23}. Sua fisiopatologia, diferentemente dos marcadores presentes no DM1, não apresenta indicadores específicos da doença, e em pelo menos 80 a 90% dos casos, associa-se ao excesso de peso e a outros componentes da síndrome metabólica^{24,25}.

O DM2 favorece o aumento da morbidade e da mortalidade por doenças cardiovasculares. A íntima relação entre o DM2 e as doenças cardiovasculares leva à hipótese do "solo comum", ou seja, as duas apresentam mesmo componente genético e mesmos antecedentes ambientais, sendo a resistência insulínica considerada um dos principais possíveis antecedentes²⁶. Assim, Ceriello & Motz em 2004 apresentaram a hipótese do "Stress Oxidativo como fator patogênico comum para a disfunção de células β e endoteliais". A hipótese considera o indício da associação da supernutrição com o desenvolvimento progressivo de DM2 e aumento do risco cardiovascular, notável no cenário clínico²⁶. A Figura 1 adaptada da publicação original por Katia e col.²⁷, sumariza a hipótese .

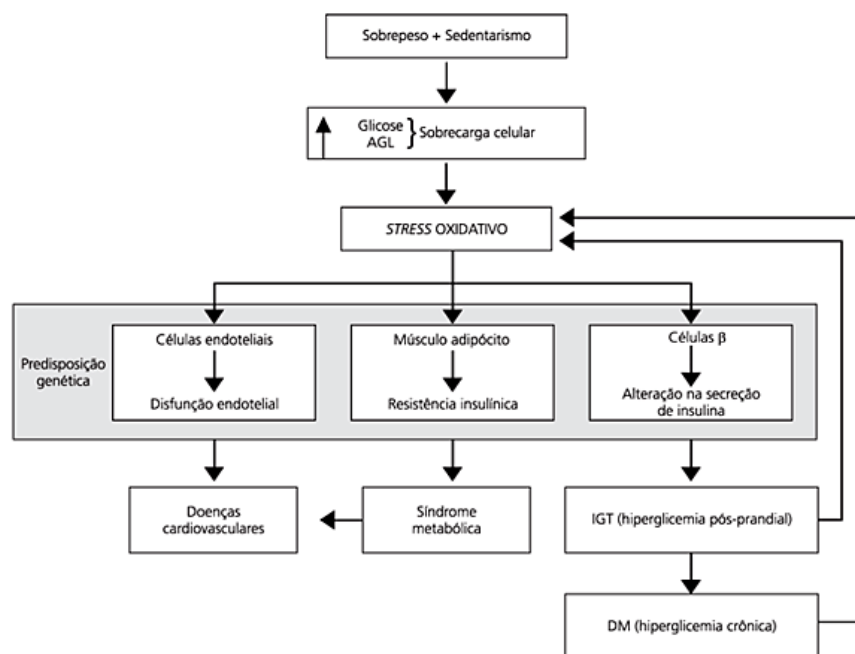


Figura 1. A relação do *stress* oxidativo, resistência à insulina, o Diabetes *Mellitus* e as doenças cardiovasculares pela hipótese "solo comum"²⁷.
Fonte: Rev. Nutr. vol.20 no.5 Campinas Sept./Oct. 2007

O sobrepeso e o sedentarismo levam ao aumento da glicose e ácidos graxos livres (AGL) nas células, que quando metabolizados e transformados em energia são acompanhados de um aumento na formação de radicais livres (*stress oxidativo*). As células musculares e os adipócitos podem se proteger desta condição, produzindo resistência à ação da insulina com o objetivo de reduzir a entrada de glicose e AGL nas células. As células β e o endotélio são tecidos não dependentes de insulina, sendo assim a sobrecarga de glicose e AGL nestas células provoca *stress oxidativo* que induz a disfunção endotelial e das células β ²⁷.

A disfunção endotelial pode levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A disfunção das células β pode ser caracterizada por uma alteração na secreção de insulina. Esta condição se agrava na presença de resistência insulínica, visto que existe um maior requerimento secretório de insulina para a manutenção das concentrações plasmáticas normais de glicose. A disfunção das células β , caracterizada por uma diminuição da secreção de insulina, e a hiperglicemia pós-prandial produzem o quadro clínico de tolerância diminuída à glicose (TDG). A hiperglicemia pós-prandial induz ao *stress oxidativo*. A persistência desta condição provoca exaustão das células β e, conseqüentemente o DM. O *stress oxidativo* ocorre tanto na condição de IGT como de DM e pode contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Além disso, todos os fatores de risco que acompanham a resistência à insulina também contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais²⁷.

Diversas bases fisiológicas explicam a indução de resistência à insulina através dos fatores de risco modificáveis, como a obesidade e o sedentarismo. A distribuição da adiposidade corporal central é indicativa de acúmulo de gordura visceral, e esse tecido hipertrofiado pela infiltração de adipócitos e macrófagos, produz citocinas pró-inflamatórias e gera resistência à insulina^{26,28}.

No entanto, as causas exatas para o desencadeamento do DM2 não são completamente conhecidas, apenas os fatores de risco que contribuem para tal¹². A idade, a etnicidade, história de DM gestacional, bem como a susceptibilidade genética²⁹, têm sido alvo de vários estudos genômicos, na intenção de elucidar o complexo mecanismo genético e as complicações de DM2³⁰. Assim como, a epigenética através de fenômenos hereditários e influenciados pelo ambiente, oferecendo uma janela para a transmissão transgeracional dos efeitos de exposições ambientais também são investigados. Estudos epigenéticos da doença têm tipicamente procurado descobrir associações entre regiões de DNA diferencialmente metilados ou modificações

específicas de histonas e fenótipos da doença^{31,32}.

1.3 Nefropatia Diabética

A ND é uma complicação microvascular renal do DM, promovida pelo enfraquecimento da membrana basal glomerular, diminuição de números de podócitos, glomerulocitose e fibrose tubulointersticial, caracterizando o aumento de proteínas excretadas através da urina (proteinúria), principalmente albumina³³, e perda progressiva da função renal³⁴. Observou-se uma incidência cumulativa da ND nos últimos 10 anos em 40%, principalmente em pacientes com DM2 sendo uma causa importante de morbidade e mortalidade entre esses indivíduos³⁵.

Os marcadores clínicos da função renal dos pacientes com DM, incluem a Excreção Urinária de Albumina (EUA) e a Taxa de Filtração Glomerular (TFG). A relação desses dois parâmetros com desfechos adversos renais são extensamente reconhecidas³⁶. O fenótipo da doença renal não albuminúrica, caracterizada por redução isolada da TFG, tem sido cada vez mais reconhecido, devido às diversas apresentações e espectros clínicos da Doença Renal Diabética (DRD)².

A DRD, na forma de elevação da EUA, pode acometer de 30 a 50% dos pacientes com DM e em aproximadamente 1/5 dos casos, observa-se redução isolada da TFG³⁷. Assim, o termo “Nefropatia Diabética” deve ser reservado somente para pacientes com proteinúria detectável persistente, em geral associada a uma elevação da pressão arterial (PA)².

Diferentes são as apresentações clínicas da DRD, ora com aumento progressivo da EUA e a queda TFG³⁸, ora com, aumento da EUA e TFG normal, fato que aumenta a necessidade da busca por biomarcadores renais mais confiáveis, com maior sensibilidade e especificidade, para a previsão antecipada do início e monitoramento da progressão da DRD³⁹.

De acordo com o estudo conduzido por Maasic *et al*(2014), várias proteínas e enzimas tubulares foram detectáveis antes da elevação da EUA e da queda da TFG: lipocalina associada a gelatinase neutrofílica (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, NGAL), N-acetilglucosamina (*N-acetyl glucosaminidase*, NAG), molécula 1 de lesão renal (*kidney injury molecule 1*, KIM-1), α 1- e β 2-microglobulinas, proteína ligante de ácido graxo (*fatty acid binding protein*, L-FABP) e proteína ligante de retinol 4 (*retinol binding*

protein 4, RBP4) confirmando-se o acometimento dos túbulos e do interstício renal precedendo o envolvimento glomerular³⁹.

A expressão da lesão glomerular e o diagnóstico de DRD, ainda se baseiam nos valores de EUA. No entanto, têm sido investigados, através de outros marcadores como a excreção urinária de transferrina, ceruloplasmina, adiponectina, laminina e proteínas podocitárias na tentativa de definir qual o verdadeiro papel desses biomarcadores na detecção precoce da DRD, porém, até o momento, nenhum dos biomarcadores estudados mostrou-se superior a albuminúria^{39,40}.

A DRD tem sido historicamente classificada em três fases: normoalbuminúria, microalbuminúria e macroalbuminúria⁴¹, utilizadas pela *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO), representante das diretrizes de nefrologia, porém, devem ser substituídas pela nomenclatura “albuminúria normal” e “albuminúria elevada” para valores acima do normal, por recomendação da ADA⁶. A KDIGO confirma a modificação, reforça o abandono do uso dos termos, mas divide a EUA em três tipos: “albuminúria normal”, “albuminúria aumentada” e “albuminúria muito aumentada”⁴², conforme apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Classificação KDIGO (2012)⁴² de nomenclatura e valores de correspondência da albuminúria, para detecção da DRD.

Excreção Urinária de Albumina (EUA)	VALORES
Albuminúria normal	< 30 mg/g = mg de albumina/g de creatinina
Albuminúria elevada	30 a 300 mg/g
Albuminúria muito elevada	> 300 mg/g)

Fonte: Adaptado das Diretrizes Brasileiras de Diabetes².

A DRD permanece sendo a principal causa de Doença Renal Crônica (DRC) em pacientes que ingressam em programas de diálise^{43,44,45}. De acordo com a KDIGO, a prevalência estimada de indivíduos com diferentes graus de disfunção renal em muitos países, varia de 8 a 16%, o que representa um enorme contingente de pessoas que

potencialmente necessitarão de terapia renal substitutiva⁴⁶, se apresentarem progressão de sua DRC para fases finais⁴⁷.

1.4 O Eixo Renina-Angiotensina-Aldosterona e Diabetes

As pesquisas sobre as ações do sistema renina-angiotensina (SRA) nos trazem sólidas informações sobre como esse sistema é capaz de contribuir, de forma expressiva, na homeostase hidroeletrolítica, no controle da pressão arterial (PA), na regulação de processos metabólicos, na modulação do crescimento e da proliferação celular de vários tecidos. Assim, a capacidade desse sistema de se adaptar ou contribuir para uma doença está intimamente relacionada ao seu envolvimento em processos tanto fisiológicos como fisiopatológicos⁴⁸.

Cada vez mais, a hiperatividade do SRA tem sido relacionada à gênese de várias doenças como a hipertensão arterial (HA), o infarto agudo do miocárdio, a insuficiência cardíaca congestiva, as arritmias cardíacas, o DM, a insuficiência renal crônica e o acidente vascular encefálico⁴⁸.

O clássico SRA tem início na ação da renina circulante e, é no aparelho justaglomerular pertencente a microvasculatura renal, o local onde se localizam as células responsáveis por sintetizar a renina e liberá-la no sangue quando há queda da pressão arterial⁴⁹. Assim, a renina circulante atua sobre o angiotensinogênio para produzir um decapeptídeo angiotensina I (Ang I) que é convertida em octapeptídeo angiotensina II (Ang II) através da enzima conversora da angiotensina (ECA). A angiotensina II considerada como principal componente hipertensor desse sistema, atua como um hormônio circulante via receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT1) e receptores de angiotensina II do tipo 2 (AT2)⁵⁰.

A ECA é uma metalopeptidase transmembrana de zinco, que possui papel importante no metabolismo dos peptídeos vasoativos^{51,52} e, está ligada a membrana de superfície endotelial por um peptídeo de âncora, que pode sofrer a lise por ECA secretase para formar uma solução solúvel chamada enzima ECA sérica⁵³. A ECA sérica, todavia, é a maior e, certamente, o determinante final da existência dos níveis de Ang II na circulação e em muitos tecidos⁵⁰.

A Ang II é a maior reguladora do equilíbrio hemodinâmico e da homeostase de líquidos e do sódio e também participa, de forma importante, no crescimento celular e do

processo de remodelamento cardiovascular. A Ang II, mediada pelo receptor AT1, age no controle da pressão arterial provocando vasoconstricção, liberação de aldosterona pela glândula adrenal e estimulando a retenção de sal nos túbulos renais^{54,55}. Os receptores AT1 são encontrados de forma abundante nos vasos, rins, coração, fígado e cérebro, atuando na regulação da pressão arterial (PA).

Mais recentemente, foi descrito que a Ang II pode ser responsável pela geração de radicais oxidativos e estar envolvida no processo de inflamação, aterosclerose e envelhecimento vascular. Estudos experimentais em ratos mostram que a infusão de Ang II causa redução da adiponectina, aparentemente, via receptor AT1. A supressão da adiponectina pode representar o mecanismo pelo qual a Ang II induziria a intolerância à glicose. Outras ações metabólicas da Ang II incluem a modulação pró-inflamatória, o aumento da secreção de insulina e a apoptose das células β pancreáticas, confirmando a estreita relação com o DM⁵⁶.

Assim, a Ang II é um dos principais fatores envolvidos no dano tecidual induzido pela hipertensão, expondo os capilares intraglomerulares e a resistência vascular pré-glomerular aos efeitos deletérios de pequenos aumentos da PA⁵⁷. A hipertensão intraglomerular é uma das mais consistentes anormalidades observadas nos pacientes com ND⁵⁸.

1.5 O polimorfismo do gene *ECA*

O polimorfismo são as diferentes mutações pontuais que podem ocorrer na sequência de DNA. As alterações em um *locus* incluem aquelas que mudam a sequência de DNA, mas não mudam a sequência da proteína, aquelas que mudam a sequência da proteína sem mudar a sua função, aquelas que criam proteínas com diferentes atividades e ainda aquelas que criam proteínas mutantes que não são funcionais⁵⁹. Essas alterações gênicas podem conferir diferenças individuais na ocorrência do DM, como também a outras doenças complexas, como insuficiência renal crônica, doenças cardíacas e câncer⁶⁰.

Estudos analisam os polimorfismos de vários genes responsáveis por alterações hemodinâmicas, endoteliais, pressão sanguínea e a exposição ao estresse oxidativo. O principal foco é investigar as diferenças na prevalência de variações polimórficas e incorporar novas variantes genéticas aos modelos de previsão de risco para a doença e

suas complicações³⁰. Atualmente, 59 *locis* foram identificados e confirmados na associação à susceptibilidade e complicações do DM2. Tais polimorfismos, atuando em conjunto com fatores ambientais e estilos de vida, promovem o desencadeamento de alterações microvasculares que resultam na disfunção, danos ou falência de vários órgãos, incluindo os rins⁶¹.

Vários fatores podem predispor o indivíduo diabético à ND, tais como hiperglicemia crônica, aumento da PA e alterações genéticas⁶². A ND por ocorrer em grupos familiares, é uma condição que fortalece o papel dos fatores genéticos^{63,64}.

Rigat e col., em 1990 identificou o gene *ACE 21kb*, codificante para a enzima conversora de angiotensina (ECA). O gene está localizado na posição 23.3 do cromossomo 17 constituído por 26 éxons, podendo apresentar um polimorfismo I/D (rs1799752) causado pela inserção (I) ou deleção (D) de um elemento Alumínio (*Alu*) de 287 pares de bases no íntron 16⁶⁵. A localização citogenética do polimorfismo I/D do gene *ECA* é demonstrado na figura 2.

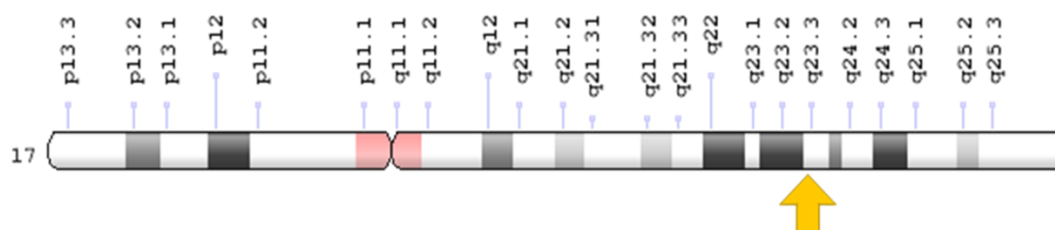


Figura 2. Localização Citogenética: 17q23.3 do polimorfismo I/D do gene *ECA*

Fonte: Genome Decoration Page / NCBI.

O foco dos estudos voltou-se para o gene *ECA*, devido à sua importância como regulador da micro e macrocirculação, e da homeostase eletrolítica renal através do SRA⁶⁶.

Assim, em 1995 foram publicados os primeiros estudos sobre o polimorfismo e ND^{67,68,69,70}, sendo encontradas diferenças significativas nos níveis séricos de ECA de indivíduos saudáveis, relacionados aos três possíveis genótipos (I/I selvagem, I/D heterozigoto mutante, D/D homozigoto mutante). As variantes desse polimorfismo nos refletem diferentes níveis de ECA sérica, sugeriu-se que o gene *ECA* desempenha um papel significativo na patogênese da hipertensão essencial. Entende-se por hipertensão essencial, ou idiopática, ou primária, o tipo mais comum que não tem uma causa atribuível e identificável⁷¹.

O efeito funcional deste polimorfismo se dá sobre os níveis de ECA, que tem como consequência fisiológica diferentes níveis circulantes de AgII, que também pode contribuir para expansão mesangial da ND, por estimular a deposição de matriz extracelular. Existem evidências de que este hormônio determina deposição de colágeno neste sítio, que pode ser mediada por aumento na expressão de fatores de crescimento, tais como o TGF- β (*transforming growth factor beta*), verificada em cultura de células mesangiais glomerulares. As células mesangiais são células encontradas nos corpúsculos renais, possuem um formato irregular e presença de microfilamentos de actina e miosina em seu citoplasma, dando as essas células, a capacidade de contração das arteríolas eferentes e aferentes⁵⁷. O acúmulo de matriz extracelular é a clássica manifestação histopatológica da glomeruloesclerose progressiva da ND. Os efeitos deletérios AgII têm sido demonstrados em estudos experimentais nos quais as infusões resultaram em aumento da pressão intraglomerular⁷² e da excreção de proteínas⁷³.

Baseado nas constatações de que a hipertensão intraglomerular era uma das mais consistentes anormalidades observadas na ND, antecipava-se que o emprego dos inibidores da ECA poderia ter um papel mais importante no controle desta complicação diabética. De fato, experimento com ratos diabéticos mostrou que o inibidor da ECA acarretava redução da pressão intraglomerular, independente de alteração da pressão arterial sistêmica e que este efeito decorria do bloqueio da formação de AgII, uma vez que promovia vasodilatação preferencial da arteríola eferente⁵⁸.

Os primeiros resultados dos estudos sobre o polimorfismo I/D do gene *ECA*, indicaram a possível associação e susceptibilidade para ND em DM insulino-dependente (IDDM)⁷⁴ e aplicava-se ao DM2 não insulino-dependentes (NIDDM)⁶⁷. Alguns pesquisadores não apoiaram estes resultados, uma vez que em seus respectivos estudos indicaram forte associação com complicações microvasculares⁷⁵, macrovasculares⁶⁹ e a progressão da ND⁷⁶, porém, nenhuma associação com ND primária^{63,77}.

As discrepâncias nos resultados de diferentes estudos provêm da variabilidade genética apresentada nas distintas populações onde o polimorfismo fora estudado: japoneses⁷⁰, alemães⁶⁷, australianos⁷⁸, do reino unido⁷⁹, italianos⁸⁰, indianos⁸¹, turcos⁸², tornando a associação prejudicada, uma vez que diferenças genéticas ocorrem nestas populações. As variações na carga genética de populações têm papel fundamental na seleção natural de genótipos mais vantajosos em uma determinada condição ecológica, portanto, estas características distribuídas aos seus descendentes se tornam cada vez mais heterogêneas, dificultando associações genéticas.

O principal fator atribuído à divergência dos resultados ocorreu devido aos diferentes caminhos metodológicos dos estudos¹⁹. Os métodos adotados para as análises da associação do polimorfismo e ND basearam-se na sua maioria, em estudos de coorte^{79 83 84}. Ao adotarem como critério de inclusão do estudo o tempo da duração do diagnóstico de DM maior que 10 anos de exposição, inclinaram-se ao potencial risco de viés de sobrevivência e viés de seleção por exposição, com base no pressuposto de que os indivíduos tinham atingido o tempo suficiente de exposição à DM para desenvolverem complicações como ND. Conseqüentemente, a exclusão de indivíduos com diagnósticos de curtos períodos, ou seja, menores que 10 anos, se tornou um grave viés de seleção, uma vez que a gravidade da doença não apenas relaciona-se ao tempo de exposição, como também do sucesso do controle dos fatores de risco associados e comorbidades envolvidas, sendo assim, muitos pacientes podem não ter sobrevivido ao tempo estipulado para inclusão no estudo⁸⁵.

A identificação de genes marcadores da susceptibilidade a doenças tem sido realizada por meio de estudos caso-controle, comparando-se as frequências de um determinado gene polimórfico entre as populações doentes e sadias⁸⁶. Analisar o provável desbalanço molecular gerado pelo polimorfismo I/D do gene *ECA* através dos genótipos de pacientes com DM2, para que seja possível prever o risco genético⁸⁷ desses indivíduos em serem acometidos por ND, faz-se necessário. A identificação de marcadores genéticos fornecem mudanças na forma de avaliação, tratamento e cuidados dos pacientes.

1.6 Saúde Baseada em Evidências

Segundo a Cochrane Collaboration, Saúde Baseada em Evidências (SBE) é o uso consciencioso das melhores evidências disponíveis na atualidade na tomada de decisões sobre o cuidado de pacientes individuais ou para serviços de saúde. Na atualidade, as melhores evidências disponíveis são os dados atualizados de pesquisas relevantes e válidas sobre⁸⁸ os efeitos de diversas formas de cuidados de saúde⁸⁹, o potencial lesivo de agentes particulares, a acurácia de testes diagnósticos e o poder preditivo de fatores prognósticos.

A partir destes conceitos, a prática clínica baseada em evidências com a tomada de decisões em que todos os profissionais da saúde devem usar as melhores evidências disponíveis, assegura que a organização dos serviços de saúde para a atenção ao

paciente com diabetes, seja em todos os níveis de abordagem desde a atenção básica até a alta complexidade⁹⁰.

Tremendos são os esforços para descobrir a patogênese complexa do diabetes e suas complicações cardiorrenais, devido a sua característica multifatorial, o DM promove a epidemia da DRD e ND. Torna-se com necessária urgência, que a comunidade de profissionais envolvidos diretamente com estes indivíduos, visem à prevenção, forneçam liderança no diagnóstico precoce, melhor manejo e portanto mais agressivo das terapias através de intervenções custo-efetivas, assim como a educação para desacelerar o impacto nestas complicações crônicas e morbi-mortalidade desta população⁹¹.

Em *2015 IWGDF Guidance Documents* manteve a recomendação do Consenso Internacional sobre Pé Diabéticos: com a introdução de equipes na comunidade e de ambulatórios ligados a hospitais ou a centros especializados, de modo a estabelecer, gradualmente, uma rede integrada para atendimento de pacientes com DM que apresentem problemas nos pés. A inserção de profissionais e especialistas segue o nível de complexidade do atendimento proposto. Considerando o êxito da prevenção e do tratamento de complicações advindas de uma organização bem estruturada, sob a perspectiva holística, com integração das várias disciplinas profissionais, aplicando-se recomendações com base em evidências⁹².

No Brasil, o baixo desempenho dos sistemas de saúde, fatores sociais e culturais podem potencializar a frequência do DM, associado a maiores taxas de hospitalizações, ocasionando assim, importante carga tanto nos custos diretos para o sistema de saúde e para a sociedade como nos custos indiretos atribuíveis a mortalidade e as incapacitações temporárias e permanentes decorrentes de suas complicações².

Com a finalidade de apoiar e direcionar os tratamentos, a biologia molecular está intimamente relacionada à promessa emergente de uma medicina mais personalizada, com o desenvolvimento de tratamentos específicos de acordo com a necessidade individual⁶⁰.

2 JUSTIFICATIVA

A análise da predisposição genética vinculada aos fatores ambientais favorece o entendimento na patogênese das doenças complexas, incluindo o DM2. A diversidade genética do conjunto de genes humanos, o nível de expressão e atividade de enzimas responsáveis pelas reações se diferem e nos proporciona várias interpretações⁸⁶.

A importância do gene *ECA* como regulador da micro e macrocirculação, e da homeostase eletrolítica renal através do sistema renina-angiotensina-aldosterona na patogênese das doenças cardiorenais é amplamente aceito, assim como a ativação do SRA mediada por alterações no estilo de vida, em particular no padrão alimentar e no nível de atividade física em uma população com provável suscetibilidade genética⁹³. O gene *ECA* que expressa essa importante enzima do SRA é polimórfico, apresenta o polimorfismo I/D, essa variação genética pode potencializar o risco à susceptibilidade da principal complicação dos pacientes diabéticos², a Nefropatia. Portanto, estabelecer se esse polimorfismo é marcador de susceptibilidade, pode reduzir o impacto à ND, por ser uma ferramenta para a seleção de grupos que poderiam se beneficiar de medidas preventivas e/ou de intervenções diagnósticas e terapêuticas precoces⁹⁴.

Estudos sobre a associação do polimorfismo I/D no gene *ECA* tem apresentado resultados conflitantes, nem sempre confirmando essa associação. Devido aos métodos diferentes de seleção de indivíduos dos estudos, progressão da doença em populações distintas, complicações vasculares multifatoriais, tempo de exposição à doença, foram e ainda são as causas dos fatores de viés dos resultados destes estudos⁸⁵.

Visando elucidar e extrair uma informação conclusiva aos dados preexistentes incongruentes, realizar uma meta-análise para a combinação dos resultados dos estudos realizados de forma independente⁹⁵, contribui para o nível de conhecimento do papel deste polimorfismo na Nefropatia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a associação do polimorfismo do gene *ECA* com a nefropatia diabética.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analisar a susceptibilidade à nefropatia diabética nos indivíduos com diabetes mellitus tipo 2;
 - ✓ Estabelecer as frequências genotípicas e alélicas do gene *ECA*;
 - ✓ Analisar demograficamente a população dos estudos incluídos;
 - ✓ Auxiliar a criação de um painel de marcadores genéticos que poderão ser utilizados como ferramenta de auxílio para a determinação do risco e diagnóstico de nefropatia diabética.
-

4 MÉTODOS

4.1 Local da Pesquisa

Esta pesquisa foi idealizada e realizada no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) no campus II da Universidade Federal de Goiás (UFG), no Laboratório de Patologia Molecular (LPM) em integração com o Sistema de Gestão Unificada, Avaliação e Revisão de Informações (SUMARI), o software do Instituto Joanna Briggs (JBI) para a revisão sistemática da literatura.

4.2 Revisão sistemática de etiologia e risco

Visando extrair uma informação adicional e conclusiva aos dados preexistentes incongruentes, optamos por uma revisão sistemática de estudos observacionais por mostrarem-se mais adequados para evidenciar efeitos adversos raros ou tardios associados, oferecendo uma indicação mais precisa. Uma vez que, lançam mão de uma dada situação e observam os resultados daí resultantes, os estudos observacionais são frequentemente mais representativos da população-alvo do que ensaios clínicos randomizados⁹⁶ que podem ser contexto dependente.

A escolha de uma revisão sistemática de etiologia e risco com estudos do tipo caso-controle, torna possível a seleção dos tipos de participantes e a exposição de interesse para análise dos desfechos⁹⁵.

4.3 Protocolo de Registro

O protocolo de pesquisa foi registrado no PROSPERO (CRD42018083792) e publicado no banco de dados em 10 de janeiro de 2018. <https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO>.

4.4 Seleção de estudos

Foram considerados estudos do tipo caso-controle, publicados e não publicados, sem restrição de idiomas, desde o ano de 1995, pois se refere ao período em que foi publicado o primeiro estudo a cerca deste polimorfismo. Foi empregada uma estratégia de pesquisa em três etapas. Primeiramente, uma pesquisa limitada, seguindo a análise das palavras do texto contidas no título, resumo e as palavras-chaves usadas para descrever o artigo. Em segundo, com todas as palavras-chaves e termos do índice identificados nos bancos de dados: PubMed e Cochrane Library. A pesquisa de literatura cinza e estudos não publicados utilizou o Google Scholar. Em terceiro, as listas de referências de todos os relatórios e artigos identificados foram salvos para estudos adicionais.

As palavras-chaves usadas na pesquisa incluíram todas relacionadas ao gene *ECA*, polimorfismo, diabetes mellitus tipo II e nefropatia diabética. A pesquisa combinou os unitermos “polymorphism”, “ACE gene”, “diabetic nephropathy”, em combinação com o operador booleano “AND”.

Os artigos de texto completo foram salvos após a revisão do título e do resumo. A estratégia de pesquisa proposta, abordou os seguintes critérios de inclusão:

- a) estudos com seres humanos;
 - b) adultos e etnias de todos os países;
 - c) indivíduos diagnosticados com diabetes *mellitus* tipo 2 seguindo os critérios estabelecidos da *World Health Organization* (WHO) e ADA tabela 2;
 - d) todos os participantes dos estudos deveriam ter sido avaliados quanto à função renal, por taxa de excreção de albumina e taxa de filtração glomerular, seguindo os valores de referência internacionais padronizados^{3,97} descritos na tabela 4. Em nosso trabalho, seguimos com a utilização dos termos “micro e macroalbuminúria” da KDIGO, uma vez que os artigos avaliados nesta meta-análise seguiram os padrões de termos internacionais, antes desta nova recomendação.
-

Tabela 4. Valores de excreção urinária de albumina e taxa de filtração glomerular (2014).

Microalbuminúria entre 20-200 µg/min ou de 30-300 mg por 24horas;

Macroalbuminúria ≥300 mg/24horas com proteinúria persistente superior a 500 mg/24horas

Taxa de filtração glomerular ≤ 60 ml/min/1,73m²

Fonte: Committee on Diabetic Nephropathy⁹⁷

e) tempo mínimo de três anos de diagnóstico de DM2 para ambos os grupos a serem analisados;

f) genotipagem do gene *ECA* (I/I, I/D e D/D);

g) análise molecular do polimorfismo detectada através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Após a pesquisa, todas as citações identificadas foram coligadas e carregadas em software bibliográfico **Mendeley** e duplicatas removidas. Títulos e resumos foram selecionados para avaliação em relação aos critérios de inclusão para a revisão. Os estudos que atenderam aos critérios de inclusão foram recuperados na íntegra e seus detalhes importados para SUMARI (JBI). Os textos completos dos estudos selecionados foram salvos e avaliados em detalhes em relação aos critérios de inclusão sendo submetidos a um processo de avaliação crítica. Os resultados da pesquisa estão apresentados no fluxograma PRISMA, figura 3.

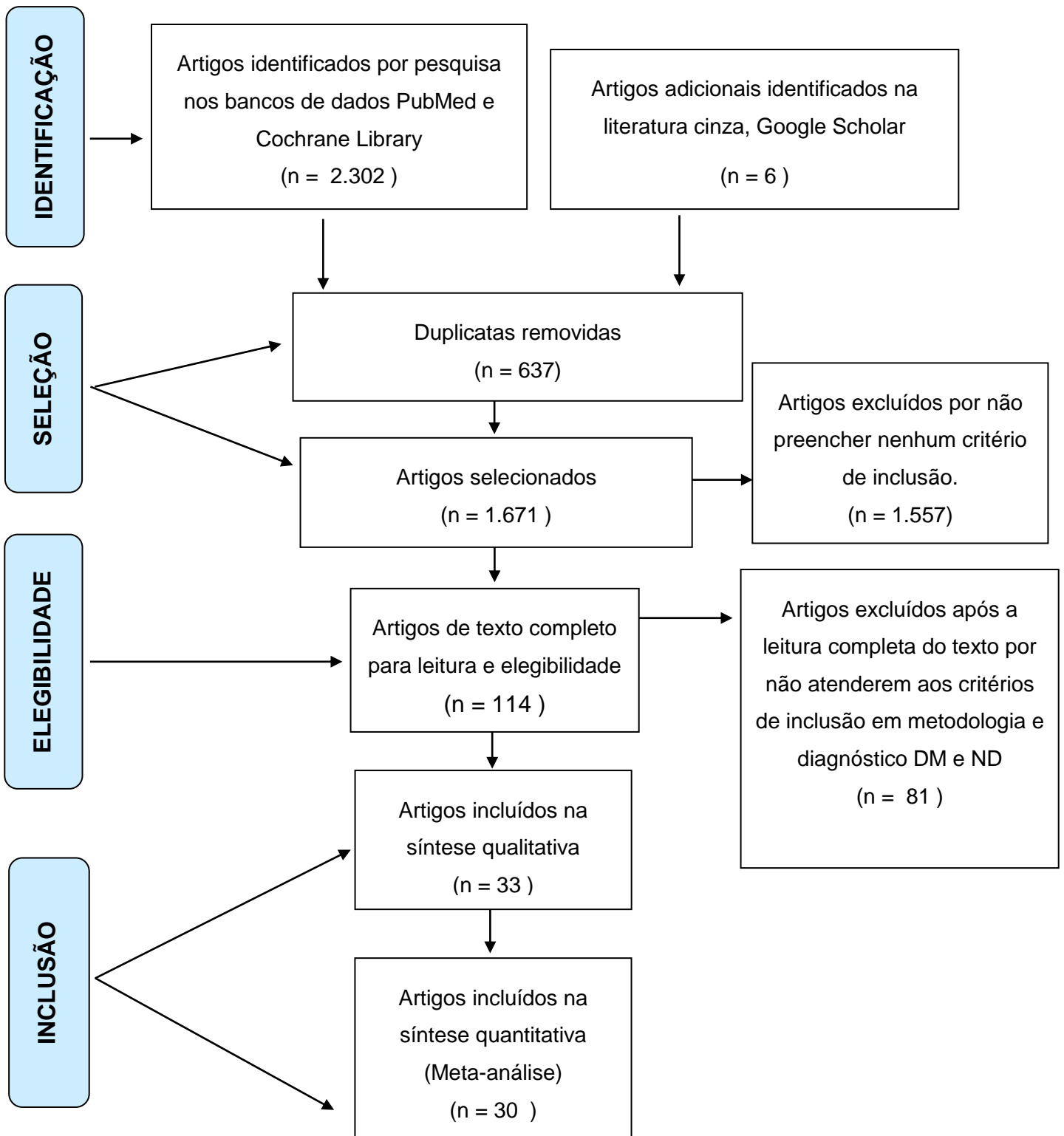


Figura 3. Fluxograma PRISMA de pesquisa e processo de inclusão dos estudos.

4.5 Avaliação da qualidade metodológica

Estudos selecionados foram avaliados criticamente por dois revisores, independentes (L.C.S e E.G.S) usando os instrumentos de avaliação crítica padronizados do Instituto Joanna Briggs para os seguinte tipo de estudo: http://joannabriggs.org/assets/docs/critical-appraisaltools/JBI_Critical_Appraisal_Checklist_for_Case_Control_Studies2017.pdf.

Todos os estudos incluídos foram avaliados qualitativamente, e o score determinado para a inclusão na síntese qualitativa foi ≥ 7 , o resultado é demonstrado no quadro 1.

4.6 Extração de dados

Todos os dados foram extraídos por um único pesquisador, usando a forma padronizada. Para cada estudo, detalhes da citação, tamanho da amostra, frequência, detalhes do diagnóstico de DM2 e ND. Os primeiros resultados extraídos foram o número de indivíduos no grupo caso e grupo controle. Secundariamente, os resultados extraídos incluídos foram o quantitativo respectivo a cada genótipo (I/I, I/D, D/D) nos dois grupos. Assim, as frequências genotípicas de todos os estudos incluídos foram agrupadas em tabela única e a diversidade avaliada com o emprego do teste de heterogeneidade (I^2) em tabelas de contingência 2x2, para a comparação das diferentes *Odds ratio* (OR), com intervalo de confiança de 95%, determinadas em seus respectivos estudos⁹⁸, como visualizados no quadro 2. Em terceiro avaliamos as características demográficas de cada estudo quanto a gênero e idade, representados na tabela 5.

4.7 Análise de dados e técnicas estatísticas

Para a aplicação do modelo meta-analítico mais adequado e obtenção da estimativa combinada, o teste I^2 foi utilizado para estimar a proporção da variabilidade total em estimativas pontuais atribuídas à heterogeneidade diferente da devida ao acaso. Os dados foram agrupados de acordo com o nível de heterogeneidade entre os estudos, usando a seguinte estratégia⁸⁵:

- $I^2 < 25\%$, meta-análise de efeitos fixos para estimar a prevalência comum (IC
-

95%), assumindo que a variabilidade entre todos ou a maior parte do estudo se deve ao acaso;

- I^2 25-75%, meta-análise de efeitos aleatórios para estimar as prevalências médias (IC95%);

- $I^2 > 75%$, heterogeneidade muito grande para estimativa resumida a ser calculada.

O software RStúdio® foi utilizado para agrupar os resultados dos estudos incluídos, e foram descritos nas formas gráfica e numérica. Na forma gráfica, os quadrados centrais representam a razão de riscos e os traços os intervalos de confiança (IC), quando o IC não ultrapassa a linha de nulidade (posição 1.0 no gráfico), pode-se afirmar que o estudo é estatisticamente significativo, tanto isoladamente quanto para o valor combinado. Quanto maior for o grupo amostral considerado no estudo, mais estreitos serão os Intervalos de Confianças (IC) e maiores serão as áreas dos quadrados, evidenciando resultados mais precisos e maior contribuição para a meta-análise⁹⁹.

O gráfico do tipo *funnel-plot* é uma das técnicas para comparar a precisão de cada estudo com seu respectivo efeito de tratamento. Esse *plot* representa no eixo vertical, a precisão dos estudos (o inverso do erro-padrão) com o efeito do tratamento (eixo horizontal) avaliado como *odds ratio*. A lógica do *funnel-plot* baseia-se no fato de que os estudos menores (com menor precisão) tenderão a se localizar na base do gráfico, com maior variabilidade ao redor da linha que representa o efeito do tratamento. À medida que o tamanho amostral dos estudos aumenta, a precisão também se eleva, enquanto a variabilidade em torno da estimativa combinada diminui. Assim, para uma meta-análise com infinitos estudos com os mais diversos tamanhos amostrais, o gráfico tenderá à forma de um funil: com os estudos de pequeno porte variando com grande intensidade (mais simetricamente) ao redor do resultado combinado, a variabilidade diminuindo à medida que a precisão aumenta e os estudos de maior tamanho amostral fornecendo estimativas muito próximas à estimativa combinada. Interessantemente, quando existe viés de publicação, o funil tenderá a ser assimétrico, com ausência na parte inferior do gráfico de estudos “negativos” de menor tamanho amostral⁶⁰.

Quadro 1. Qualidade metodológica para inclusão dos estudos.

CITATION	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10
1.Fujisawa 1995	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
2.Mizuiru 1995	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
3.Panagiotopoulos 1995	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
4. Doi 1996	Y	Y	Y	Y	N	N	N	U	Y	Y
5.Ringel 1997	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
6.Schmidt 1997	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
7.Grzeszczak 1998	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
8.Hanyu 1998	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
9.Tomino 1999	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
10.Solini 1999	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
11.Taniwaki 2001	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
12.Viswanathan 2001	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
13.Arzu 2004	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
14.Prasad 2006	Y	Y	Y	Y	N	N	N	Y	Y	Y
15.Ng 2006	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
16.Nikzmir 2006	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
17.Uddin 2007	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y
18.Arfa 2008	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
19.Ezzidi 2009	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
20.Ahluwalia 2009	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
21.Palomo-Pinon 2009	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
22.El-Bazz 2011	Y	Y	Y	U	U	N	N	Y	Y	U
23.Al-Harbi 2011	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
24.Felehgari 2011	Y	Y	Y	N	Y	N	N	Y	N	Y
25.Vashrambhai 2011	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
26.Pacheco 2012	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
27.El-Baz 2012	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
28.Shaikh 2012	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
29.Bhaskar 2013	Y	Y	Y	U	Y	N	N	Y	Y	Y
30.Shaker 2014	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
31.Sancakdar 2015	Y	Y	Y	U	Y	N	N	N	Y	Y
32-A.Parchwani 2015	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
32-B.Parchwani 2015	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
33.Fawwaz 2017	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
%	100%	100%	100%	88.00%	90%	6.00%	0%	94%	97%	97%
Legend:										
Y=YES, N=NO, U=UNCLEAR, NOT=NOT APPLICABLE										
Question 1. Where the groups comparable other than the presence of disease in cases or the absence of disease in controls?										
Question 2. Were cases and controls matched appropriately?										
Question 3. Where the same criteria used for identification of cases and controls?										
Question 4. Was exposure measured in a standard, valid and reliable way?										
Question 5. Was exposure measured in the same way for cases and controls?										
Question 6. Where confounding factors identified?										
Question 7. Where strategies to deal with confounding factors stated?										
Question 8. Where outcomes assessed in a standard, valid and reliable way for cases and controls?										
Question 9. Was the exposure period of interest long enough to be meaningful?										
Question 10. Was appropriate statistical analysis used?										

Autor	Ano	Local	DM com Nefropatia							DM sem Nefropatia							OR	IC95%		Peso
			I/I		I/D		D/D		Total	I/I		I/D		D/D		Total		Inf	Sup	
			n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)		n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)					
1) Fujisawa	1995	Japão	24	44.4	23	42.6	7.0	13.0	54	17	48.6	12	34.3	6.0	17.1	35	1.178	0.507	2.735	5.41
2) Mizuiri	1995	Japão	11	13.8	50	62.5	19.0	23.8	80	11	35.5	11	35.5	9.0	29.0	31	3.390	1.305	8.804	4.22
3) Panagiotopoulos	1995	Austrália	10	20.0	25	50.0	15.0	30.0	50	29	25.2	44	38.3	42.0	36.5	115	1.315	0.593	2.919	6.05
4) Ringel	1997	Alemanha	33	20.5	84	52.2	44.0	27.3	161	36	25.7	69	49.3	35.0	25.0	140	1.340	0.784	2.288	13.41
5) Schmidt	1997	Alemanha	61	19.6	129	41.5	121.0	38.9	311	62	17.9	154	44.4	131.0	37.8	347	0.892	0.603	1.318	25.15
6) Grzeszczak	1998	Polónia	103	22.3	230	49.8	129.0	27.9	462	63	24.8	118	46.5	73.0	28.7	254	1.152	0.805	1.648	29.93
7) Hanyu	1998	Japão	7	29.2	13	54.2	4.0	16.7	24	14	66.7	5	23.8	2.0	9.5	21	4.511	1.321	15.408	2.55
8) Tomino	1999	Japão	310	41.6	337	45.2	98.0	13.2	745	163	40.0	189	46.4	55.0	13.5	407	0.929	0.727	1.188	63.52
9) Solini	1999	Itália	33	21.0	66	42.0	58.0	36.9	157	27	15.7	83	48.3	62.0	36.0	172	0.702	0.402	1.228	12.33
10) Taniwaki	2001	Japão	32	37.2	40	46.5	14.0	16.3	86	31	44.9	26	37.7	12.0	17.4	69	1.372	0.723	2.604	9.36
11) Viswanathan	2001	India	17	19.8	45	52.3	24.0	27.9	86	10	43.5	8	34.8	5.0	21.7	23	3.089	1.180	8.082	4.15
12) Ergen	2004	Turquia	5	20.0	11	44.0	9.0	36.0	25	5	10.0	21	42.0	24.0	48.0	50	0.451	0.124	1.640	2.30
13) Prasad	2006	India	67	34.2	74	37.8	55.0	28.1	196	76	33.8	97	43.1	52.0	23.1	225	0.982	0.656	1.469	23.64
14) Ng	2006	E. U.A.	47	16.2	148	50.9	96.0	33.0	291	32	19.2	83	49.7	52.0	31.1	167	1.235	0.754	2.022	15.80
15) Nikzamid	2006	Irã	12	14.1	47	55.3	26.0	30.6	85	16	18.8	52	61.2	17.0	20.0	85	1.396	0.624	3.122	5.93
16) Uddin	2007	Bangladesh	13	22.0	22	37.3	24.0	40.7	59	24	36.4	28	42.4	14.0	21.2	66	1.986	0.907	4.348	6.25
17) Arfa	2008	Tunísia	9	10.0	41	45.6	40.0	44.4	90	6	11.8	24	47.1	21.0	41.2	51	1.226	0.424	3.543	3.41
18) Ezzidi	2009	Tunísia	88	17.1	260	50.5	167.0	32.4	515	156	38.8	192	47.8	54.0	13.4	402	3.067	2.262	4.157	41.52
19) Ahluwalia	2009	India	44	18.3	64	26.7	132.0	55.0	240	49	19.2	117	45.9	89.0	34.9	255	1.058	0.675	1.659	19.01
20) Palomo-Pinon	2009	México	87	37.0	105	44.7	43.0	18.3	235	85	42.5	91	45.5	24.0	12.0	200	1.256	0.855	1.846	25.96
21) Al-Harbi	2011	Emirados Árabes	12	10.9	39	35.5	59.0	53.6	110	25	12.8	75	38.3	96.0	49.0	196	1.172	0.570	2.409	7.40
22) Felehgari	2011	Irã	6	8.8	30	44.1	32.0	47.1	68	14	19.4	32	44.4	26.0	36.1	72	2.383	0.884	6.424	3.91
23) Vashrambhai	2011	India	10	16.4	24	39.3	27.0	44.3	61	58	34.9	66	39.8	42.0	25.3	166	2.645	1.267	5.520	7.09
24) Pacheco	2012	Filipinas	6	28.6	11	52.4	4.0	19.0	21	13	61.9	5	23.8	3.0	14.3	21	3.787	1.080	13.287	2.44
25) El-Baz	2012	Egito	4	3.9	58	56.9	40.0	39.2	102	5	5.0	72	72.0	23.0	23.0	100	1.261	0.351	4.522	2.36
26) Shaikh	2012	Paquistão	18	10.7	98	58.3	52.0	31.0	168	123	41.6	148	50.0	25.0	8.4	296	5.791	3.391	9.889	13.41
27) Bhaskar	2013	India	14	25.9	29	53.7	11.0	20.4	54	24	35.8	30	44.8	13.0	19.4	67	1.573	0.723	3.424	6.35
28) Shaker	2014	Egito	7	15.6	13	28.9	25.0	55.6	45	10	25.0	20	50.0	10.0	25.0	40	1.767	0.618	5.053	3.48
29-A) Parchwani	2015	India	13	18.6	25	35.7	32.0	45.7	70	16	20.0	47	58.8	17.0	21.3	80	1.090	0.488	2.431	5.97
29-B) Parchwani	2015	India	15	20.5	27	37.0	31.0	42.5	73	17	19.8	50	58.1	19.0	22.1	86	0.950	0.441	2.046	6.53
30) Fawwaz	2017	Libano	6	12.0	20	40.0	24.0	48.0	50	14	21.9	29	45.3	21.0	32.8	64	1.966	0.717	5.392	3.77
Total			1124	23.5	2188	45.8	1462.0	30.6	4774	1231	28.6	1998	46.4	1074.0	25.0	4303	1.449	1.193	1.760	p=0.001
													Total			9077				

Quadro 2. Características dos estudos incluídos

Legenda: DM-Diabetes Mellitus; I/I-Inserção/Inserção; I/D-Inserção/Deleção; D/D-Deleção/Deleção; OR-Odds Ratio; IC95%-Intervalo de Confiança 95%; Inf-Inferior; Sup-Superior

5 RESULTADOS

Após a pesquisa inicial, 2.308 estudos foram revisados pelo título e resumo. Destes, 637 foram removidos por duplicação, 1.557 excluídos por não preencherem nenhum critério de inclusão, 114 foram recuperados em texto completo. Após leitura dos textos completos, 81 não corresponderam a todos os critérios de elegibilidade, 33 estudos foram incluídos na síntese qualitativa para avaliação de qualidade metodológica e após a análise 30 estudos foram incluídos na síntese quantitativa (meta-análise).

Um artigo Parchwani et al⁸⁷ apresenta resultado de indivíduos de origem Kutch pertencentes a diferentes comunidades (Ahir e Rabari), sendo tratado como estudo único com dois resultados, por isso a duplicata de citação no quadro de estudos.

Nesta meta-análise, 9.077 participantes com DM2 foram genotipados, 4.774 (52,6%) indivíduos com ND (casos) e 4.303 (47,4%) indivíduos sem ND (controles). Avaliados separadamente, os genótipos para o grupo caso, temos I/I (23,5%), I/D (45,8%) e D/D (30,6%). Os genótipos para o grupo controle, I/I (28,6%), I/D (46,4%) e D/D (25%). A maior prevalência observada é do genótipo I/D em ambos os grupos.

Na caracterização demográfica, quando comparamos os grupos caso e controle em relação ao gênero, o grupo caso foi constituído por 4.136 indivíduos (2.235 masculinos e 1.901 femininos), sendo a média de idade dos pacientes $58,3 \pm 4,1$ e uma predominância de homens com 54%. O grupo controle constituído por 3.834 indivíduos (1.813 masculinos e 2.021 femininos), sendo a idade média dos pacientes $58,5 \pm 3,7$ e as mulheres com 52,7% predominam no grupo. A análise estatística da distribuição de gêneros apresentou diferenças significativas, indicando que há heterogeneidade entre os grupos estudados. Quando se observa a idade, os grupos não apresentam diferenças significativas, indicando homogeneidade entre os grupos estudados. Os resultados estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Comparação das características sociodemográficas e clínicas estudadas entre os grupos caso (com Nefropatia Diabética) e controle (sem Nefropatia Diabética).

Variáveis	Com ND (n=4136)		Sem ND (n=3834)		χ^2
	n	%	n	%	
Gênero					
Masculino	2235		1813		1.715e-09*
Feminino	1901		2021		
	\bar{X}	\pm	\bar{X}	\pm	<i>p-value</i>
Idade, anos	58,34	4,18	58,52	3,71	0,86

Os dados são relatados como média (\bar{X}), desvio padrão (\pm), absoluto (n) e frequência relativa (%); Análise estatística por teste t de Student ou qui-quadrado (χ^2). * Nível de significância ($p < 0,05$); Os dados de Bhaskar (2013) não foram considerados na análise da média de idade e número de participantes; Os dados de Grzeszczak (1998), Mizuiri (1995), Fujisawa (1995) não foram considerados na análise do número de participantes.

O grupo caso com 4.774 indivíduos apresenta a frequência do alelo D mutante com 54% e o alelo I selvagem com 46%. O grupo controle com 4.303 indivíduos apresentam o alelo I selvagem em 52% e o alelo D mutante com 48%. A análise da frequência dos alelos, através do Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, é demonstrada na tabela 6.

Tabela 6. Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o Polimorfismo ACE nos grupos Caso e Controle.

Genótipo	Obs.	Exp.	χ^2 (G.L.)	<i>p</i>-value
Caso	n (%)	n (%)		
I/I (Selvagem)	1124 (23,54)	1030,48 (21,59)		
I/D (Heterozigoto)	2188 (45,83)	2375,03 (49,74)	29,61 (1)	0,0001*
D/D (Mutante)	1462 (30,63)	1368,48 (28,67)		
Total	4774 (100)	4774 (100)		
Alelos	Frequência			
I (Selvagem)	0,46			
D (Mutante)	0,54			
Controle	n (%)	n (%)		
I/I (Selvagem)	1231 (28,61)	1155,68 (26,86)		
I/D (Heterozigoto)	1998 (46,43)	2148,64 (49,93)	21,15 (1)	0,0001*
D/D (Mutante)	1074 (24,96)	998,68 (23,21)		
Total	4303 (100)	4303 (100)		
Alelos	Frequência			
I (Wild Type)	0,52			
D (Mutant)	0,48			

Legenda: Obs. – Observado; Exp. – Expectativa; GL – Grau de Liberdade.

Os gráficos do tipo *forest-plot* e *funnel-plot* gerados pelo RStudio® para o agrupamento dos resultados através da meta-análise estão nas figura 4, 5, 6 e 7. No gráfico do tipo *forest-plot*, cada linha representa um estudo, sendo que, na última linha, o losango representa a combinação dos resultados. Neste contexto foram gerados dois gráficos, um para o genótipo I/D na Figura 4 e outro gráfico para o genótipo D/D na Figura 6.

Não foram encontradas associações entre o polimorfismo I/D no gene *ECA* e ND. O *forest-plot* para o genótipo I/D com e sem ND apresentou: Heterogeneidade I^2 59%; $p < 0,01$; OR = 0,97; IC95% [0,84; 1,12] na figura 4 e o *forest-plot* para o genótipo D/D com e sem ND, Heterogeneidade: I^2 69%; $p < 0,01$; OR = 0,65; IC95% [0,54; 0,79] na figura 6.

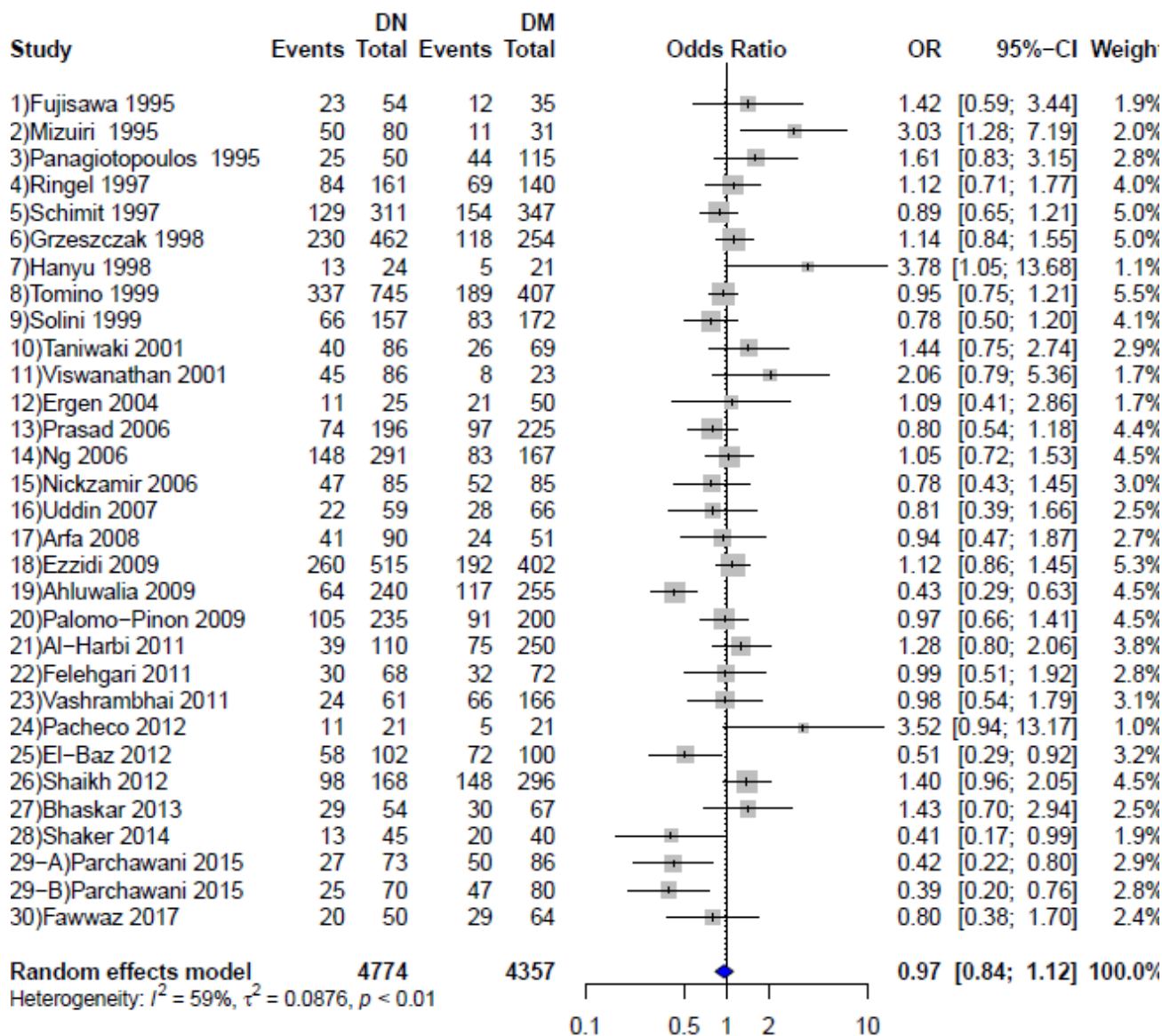


Figura 4. *Forest-plot* para o genótipo I/D

Legenda: *Odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) com limites inferior e superior, para o genótipo I/D, para todos os estudos, com o teste do Qui-quadrado de heterogeneidade para efeitos aleatórios (uso do teste de DerSimonian-Laird).

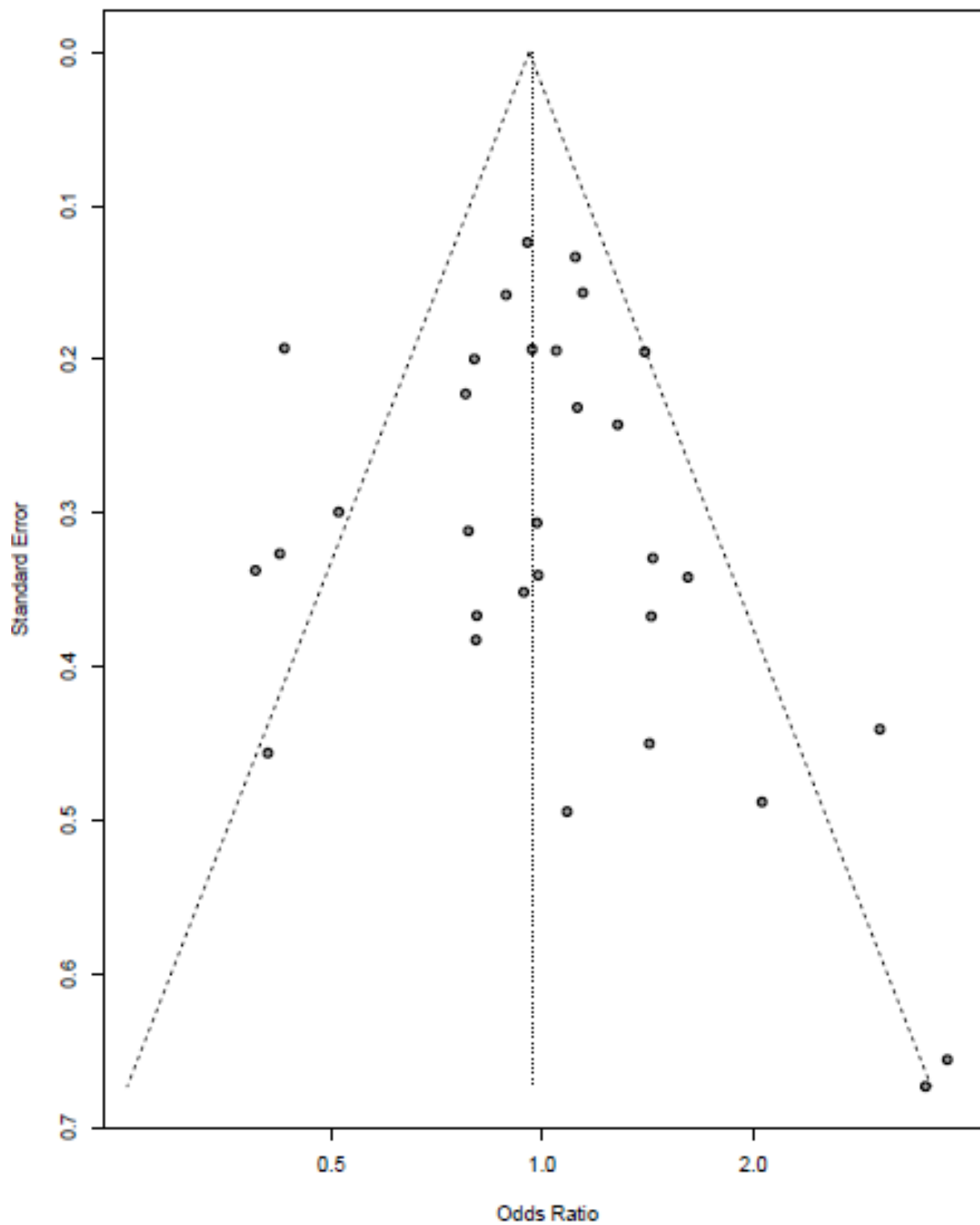


Figura 5. *Funnel-plot* para o genótipo I/D.
Fonte: Progama RStúdio®.

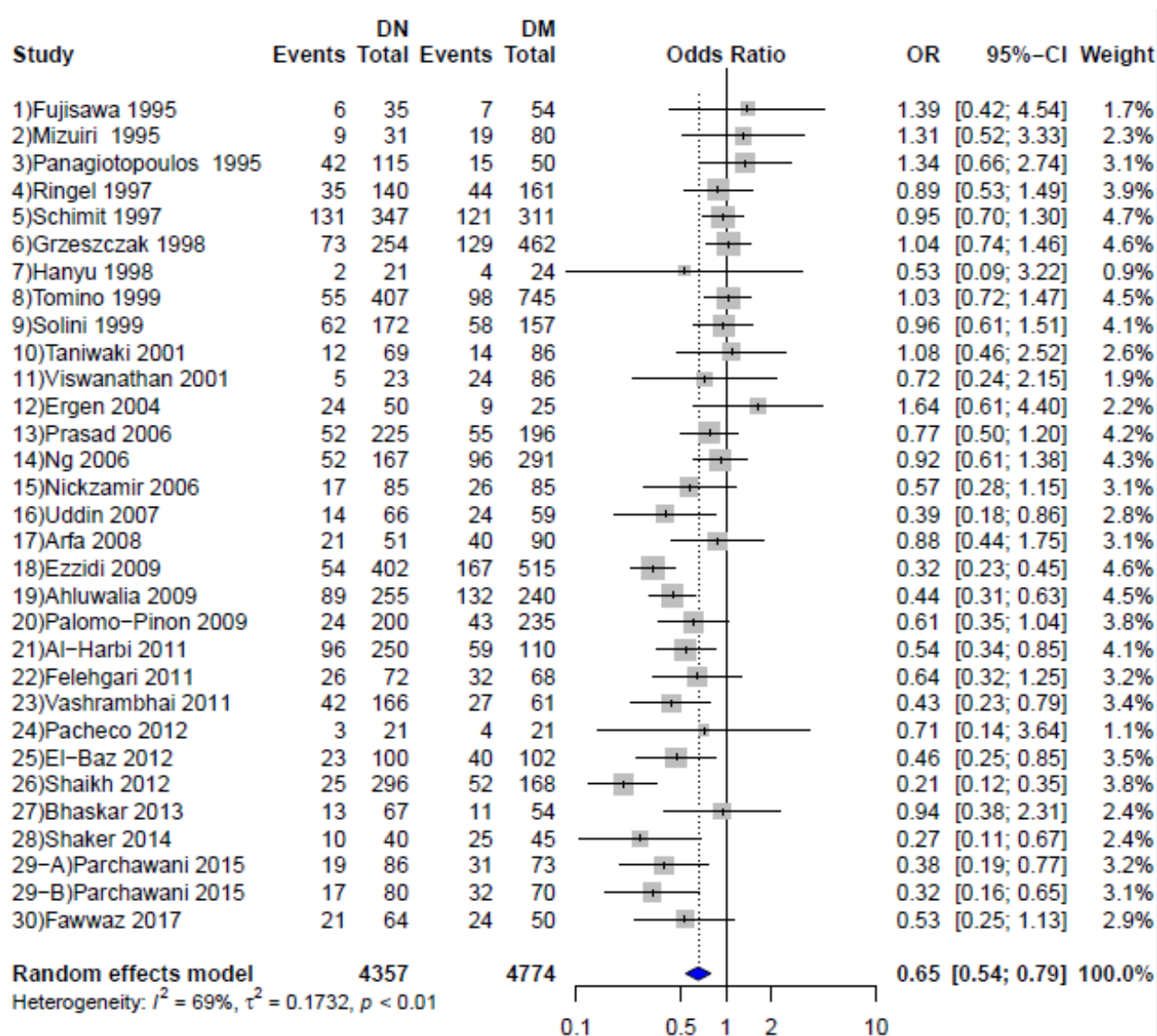


Figura 6. Forest-plot para o genótipo D/D

Legenda: Odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) com limites inferior e superior, para o genótipo D/D, para todos os estudos, com o teste do Qui-quadrado de heterogeneidade para efeitos aleatórios (uso do teste de DerSimonian-Laird).

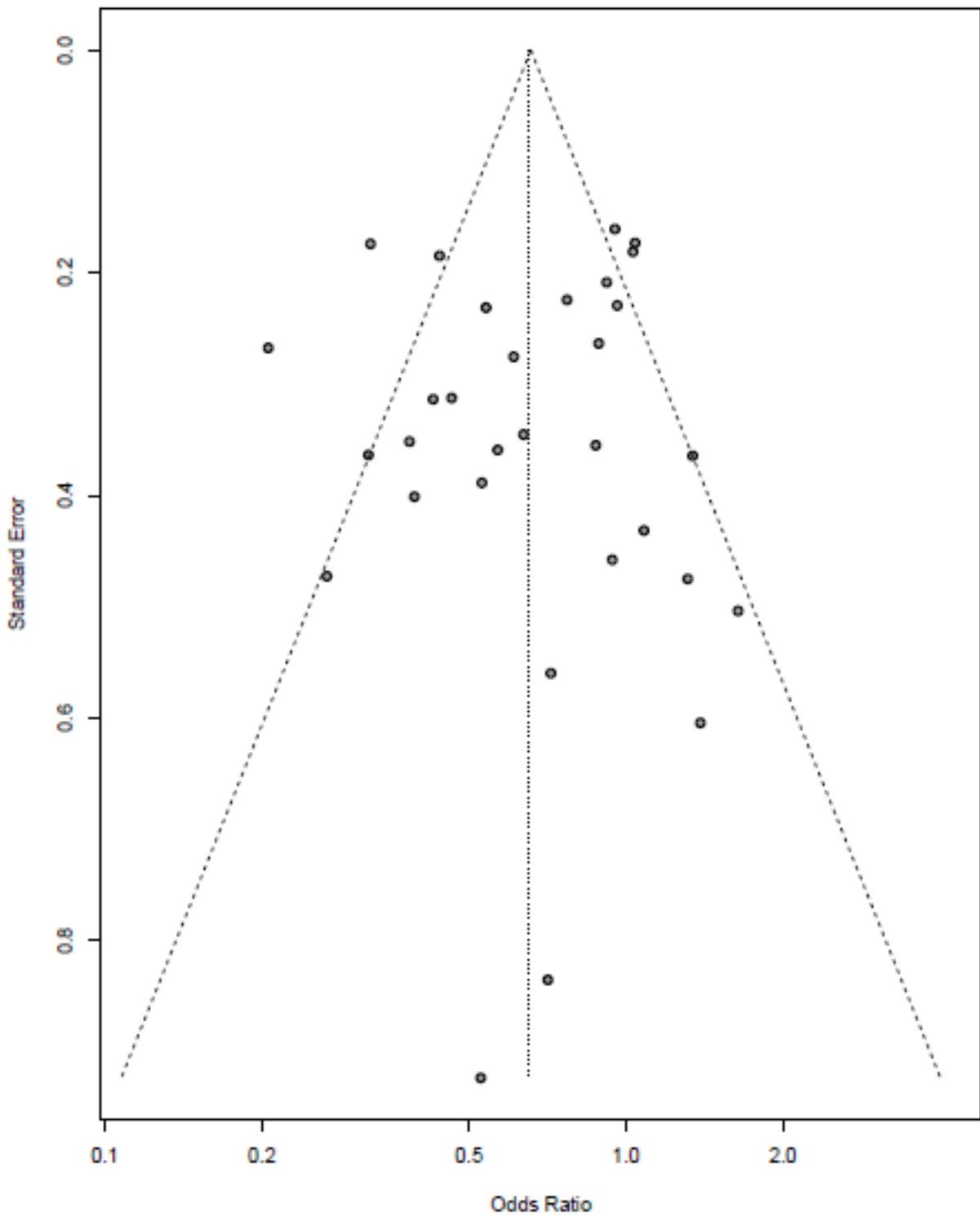


Figura 7. *Funnel-plot* para o genótipo D/D
Fonte: Progama RStúdio®.

6. DISCUSSÃO

Numerosas investigações sobre o potencial papel da ECA como um gene envolvido na susceptibilidade à ND foram realizadas nas últimas décadas, mas os resultados ainda são controversos. Meta-análises anteriores foram realizadas com o objetivo de se chegar a um consenso, porém, por tentaram tirar conclusões com dados limitados quando examinando subgrupos de pacientes específicos, tornaram-se particularmente prejudicadas em seus resultados^{100,101}.

Na tentativa de elucidar essa investigação, estudos observacionais do tipo caso-controle incluíram no grupo controle exclusivamente pacientes diabéticos normoalbuminúricos. Nosso estudo também definiu este critério, porém com um grande diferencial: o tempo reduzido de diagnóstico de DM destes indivíduos. Enquanto a maioria dos estudos se limitaram à elevados tempos (> 10 anos), nossa abordagem com tempo inferior, três anos, fornece provas mais claras para uma verdadeira associação entre o polimorfismo I/D do gene ECA e ND uma vez que o uso desses controles ajudam a reduzir a classificação errada dos casos¹⁰².

Pela certeza já estabelecida de biomarcadores³⁹ através de várias proteínas e enzimas tubulares detectáveis devido ao acometimento dos túbulos e do interstício renal precedendo o envolvimento glomerular e a queda da TFG, assim como, o fato cada vez mais comum do reconhecimento do fenótipo da doença renal não albuminúrica caracterizada por redução isolada da TFG, a escolha do pequeno tempo de diagnóstico de DM para a inclusão em grupos normoalbuminúricos são mais representativas e confiáveis da população-alvo, como confirma a Iniciativa STROBE⁹⁶.

Os pacientes DM2 que apresentaram ND mostraram distribuição de frequência contraditória do alelo mutante D em diferentes regiões do mundo¹⁰³. Os artigos são inconclusivos em todas as populações estudadas, para a associação genotípica do polimorfismo do gene ECA e ND, porém, positiva com demonstração de forte associação do alelo D com proteinúria diabética em DM2 e ND^{63,81,69,103}. Os resultados do nosso estudo corroboram com os estudos em que o alelo D está presente na maioria dos pacientes nefropáticos e minoria nos normoalbuminúricos^{104,81}, o alelo D mutante apresenta-se com 54% no grupo caso e 48% confirmando a importante significância do

alelo D como fator de desenvolvimento da ND e o alelo I como fator protetivo.

O genótipo D/D do gene ECA apresentou maior frequência nos pacientes do grupo caso com ND em comparação ao grupo controle sem ND. Confirmando o efeito co-dominante do alelo D^{105,106} aumentando significativamente o risco de insuficiências renais e ND nos pacientes DMII^{87,107,108}. O alelo D também associa-se à progressão de ND para doença renal em estágio-final^{67,109} e o desenvolvimento de DM2 em pessoas saudáveis sem diagnóstico de DM¹¹⁰.

O genótipo D/D foi associado a albuminúria no sexo feminino indicando um possível efeito de gênero associado ao genótipo na doença renal¹¹¹. A modulação dos níveis de estradiol assim como a idade em que a mulher inicia os sintomas da menopausa pode ser influenciada por participação de fatores genéticos¹¹², assim como o tratamento com estradiol diminui a atividade ECA¹¹³, receptores de angiotensina1(AT1) e a expressão de mRNA em diferentes células e tecidos¹¹⁴, sugerindo que os estrogênios podem ter um papel importante na atenuação da resposta vascular e renal à angiotensina II.

Esses achados sugerem que o hormônio limita a glomeruloesclerose, característica da ND, enquanto regula o equilíbrio entre a produção e a degradação da matriz extracelular no mesangião^{75,76}. Em nosso estudo, o grupo controle com a média de idade 58.52 ± 3.71 e as mulheres com predominância em 52,7% podem ser relacionados, pelo fato de ser compatível à idade do início da menopausa¹¹², apesar do genótipo D/D no grupo controle ter apresentado a frequência de 25%.

Ezzidi et al comparou os efeitos do polimorfismo gene ECA e também haplótipos específicos de ECA no risco de DN. Considerando o haplótipo ITA (todo tipo selvagem) como referência, a análise mostrou que todos os haplótipos contendo alelos D (DCG, DTG, DCA e DTA) foram associados com risco aumentado para ND, enquanto o haplótipo ITG foi amplamente protetor, identificando assim o alelo D como o risco putativo¹¹⁵. O alelo D foi associado ao aumento da atividade sérica de ECA em relação ao alelo I¹¹⁶. A implicação do haplótipo do alelo D específico para risco de ND é claramente intrigante, pode-se especular que esse haplótipo de risco define uma combinação específica de variações genéticas que controlam a expressão do gene ECA em tipos particulares de células, possivelmente no rim. Uma segunda possibilidade é que este haplótipo poderia estar em estreita ligação de desequilíbrio com um polimorfismo funcional ainda a ser identificado que influencia diretamente a expressão gênica⁶⁴.

Em conjunto, essas observações sugeriram que o D alelo poderia ser um fator de risco independente para ND em DM2¹¹⁷ e alelo I associado a menor risco de microalbuminúria persistente ou nefropatia grave¹¹⁸. Pacientes DM2 sem ND exibiram maior prevalência do alelo I 52% em comparação com o alelo D 48%, inversamente ao que ocorre no grupo caso¹¹⁹. O genótipo I/I para o gene ECA poderia ser um marcador de risco reduzido, menos propenso a desenvolver ND durante o curso do DM2^{106,119,68,107} pelo alelo I protetor¹²⁰.

Nosso estudo demonstrou que os genótipos avaliados separadamente não são marcadores para a previsão da suscetibilidade à ND de portadores de DM2. A questão pode ser concebida de uma forma mais abrangente, realizando a análise de haplótipos do locus ECA que se estendem além da consideração do polimorfismo I/D¹⁰².

O fator de risco metabólico têm grande relevância na evolução da ND, pois a hiperglicemia contribui para a glomeruloesclerose, fibrose intersticial e atrofia tubular. Não excluindo o polimorfismo de genes vizinhos, que a princípio afetam diretamente a expressão gênica¹¹⁵.

Sendo assim e, sem dúvida alguma, pode-se dizer que estudos de biomarcadores genéticos contribuem para a compreensão da fisiopatologia do DM, além de fornecer subsídios para estratégias de diagnóstico e prevenção do início (atenção primária), de complicações agudas e crônicas (atenção secundária) e reabilitação ou limitação das incapacidades produzidas pelas complicações (atenção terciária).

7. CONCLUSÃO

As conclusões da presente meta-análise afirmam que o polimorfismo I/D do gene *ECA* estudado através dos genótipos I/D e D/D não estão associados ao risco de desenvolvimento da ND em indivíduos com DM2. O polimorfismo I/D em questão quando apresentado através do genótipo não influencia a pré-disposição à ND, porém, a frequência do alelo D aumenta o fator de risco ao desenvolvimento ND e o alelo I expressa-se como fator protetivo à ND, uma vez que no grupo caso o alelo D mutante apresenta-se com 54% e o alelo I selvagem com 46%, e no grupo controle o alelo I selvagem em 52% e o alelo D mutante com 48%.

Demograficamente diferenças significativas são observadas em relação ao gênero da população estudada, sendo o grupo caso com 54% de homens e no grupo controle 52,7% de mulheres, porém com homogeneidade da idade entre os indivíduos 58,5 anos.

Sugerimos que novos estudos sejam feitos, com maior rigor na seleção dos grupos para que se estabeleçam detalhamento de variáveis importantes no contexto da genética humana e médica para fortalecer os dados estatísticos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Diabetes Association. Standards of Medical care in diabetes - 2017. *J Clin Appl Res Educ*. 2017;40(January):1–142.
 2. Egídio J, Paulo de Oliveira, Renan Magalhães Montenegro Junior SV. *Diretrizes 2017-2018*. São Paulo: Clannad; 2018. 383 p.
 3. Cameron F. Standards of Medical Care in Diabetes - 2016. *Aust Fam physician*. 2006;35(6):386–90.
 4. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A, DNA Illustrations I. *Imunologia Celular e Molecular*. 558 p.
 5. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas Eighth Edition 2017*. International Diabetes Federation. 2017. 150 p.
 6. American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(SUPPL.1):81–90.
 7. International Diabetes Federation. *IDF diabetes atlas - Home* [Internet]. 7 th ed. Brussels, Belgium. 2015 [cited 2018 Mar 18]. Available from: <http://www.diabetesatlas.org/>
 8. Tanase-Nakao K, Arata N, Kawasaki M, Yasuhi I, Sone H, Mori R, et al. Potential protective effect of lactation against incidence of type 2 diabetes mellitus in women with previous gestational diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2018 May 14];33(4):e2875. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dmrr.2875>
 9. International Diabetes Foundation. Chapter 1: What is diabetes? [Internet]. *IDF Diabetes Atlas*. 2017. 14-25 p. Available from: <http://www.diabetesatlas.org/across-the-globe.html>
 10. Iser BPM, Stopa SR, Chueiri PS, Szwarcwald CL, Malta DC, Monteiro HO da C, et al. Prevalência de diabetes autorreferido no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Iser BPM, Stopa SR, Chueiri PS, Szwarcwald CL, Malta DC, Monteiro HO da C, Duncan BB, Schmidt MI: Prevalência de diabetes autorreferido no Brasil: resultados . *Epidemiol e Serviços Saúde* [Internet]. 2015 Jun [cited 2018
-

May 15];24(2):305–14. Available from:
http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742015000200013&scielo=S2237-96222015000200305

11. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, et al. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2018 Mar 18];66(2):241–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27980006>
 12. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2014 Mar 22 [cited 2018 May 15];383(9922):1068–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24315620>
 13. Newton CA, Raskin P. Diabetic Ketoacidosis in Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Intern Med* [Internet]. 2004 Sep 27 [cited 2018 Mar 19];164(17):1925. Available from: <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.164.17.1925>
 14. Herman WH, Ye W, Griffin SJ, Simmons RK, Davies MJ, Khunti K, et al. Early Detection and Treatment of Type 2 Diabetes Reduce Cardiovascular Morbidity and Mortality: A Simulation of the Results of the Anglo-Danish-Dutch Study of Intensive Treatment in People With Screen-Detected Diabetes in Primary Care (ADDITION-Europe). *Diabetes Care* [Internet]. 2015 Aug [cited 2018 May 15];38(8):1449–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25986661>
 15. American Diabetes Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2018 May 15];40(Suppl 1):S11–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27979889>
 16. Group NDD. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes* [Internet]. 1979 Dec 1 [cited 2018 Mar 19];28(12):1039–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/510803>
 17. Mellitus* TEC on the D and C of D. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* [Internet]. 1997 Jul 1 [cited 2018 Mar 19];20(7):1183–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9203460>
-

18. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* [Internet]. 2004 Jan 1 [cited 2018 Mar 19];27 Suppl 1(suppl 1):S5–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693921>
 19. Al.];, Adolfo Milech...[et.José Egidio Paulo de Oliveira SV. Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes [Internet]. Vol. 5, Diabetes Mellitus Tipo 1 E Tipo2. 2003. 709-717 p. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diabetes_mellitus.PDF%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572002000300004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
 20. Rao P V. Type 2 diabetes in children: Clinical aspects and risk factors. *Indian J Endocrinol Metab* [Internet]. 2015 Apr [cited 2018 Mar 19];19(Suppl 1):S47-50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25941651>
 21. Mayer-Davis EJ, Lawrence JM, Dabelea D, Divers J, Isom S, Dolan L, et al. Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths, 2002–2012. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Apr 13 [cited 2018 May 5];376(15):1419–29. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1610187>
 22. Fazeli Farsani S, van der Aa MP, van der Vorst MMJ, Knibbe CAJ, de Boer A. Global trends in the incidence and prevalence of type 2 diabetes in children and adolescents: a systematic review and evaluation of methodological approaches. *Diabetologia* [Internet]. 2013 Jul 16 [cited 2018 May 5];56(7):1471–88. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-013-2915-z>
 23. Souza AES de, Cruz AM da, Araújo JLA, Aguiar IP de, Souza DS de. Conhecimento sobre diabetes mellitus de pacientes diabéticos atendidos em unidades de saúde do município de Santarém-Pará. *Rev Publicação Acadêmica da Pós- Grad do IESPES*. 2015;2(24):1–17.
 24. Geloneze B, Vasques ACJ, Stabe CFC, Pareja JC, Rosado LEFP de L, Queiroz EC de, et al. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arq Bras Endocrinol Metabol* [Internet]. 2009 Mar [cited 2018 May 15];53(2):281–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19466221>
 25. Simental-Mendía LE, Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero F. The Product of Fasting Glucose and Triglycerides As Surrogate for Identifying Insulin Resistance in
-

- Apparently Healthy Subjects. *Metab Syndr Relat Disord* [Internet]. 2008 Dec [cited 2018 May 15];6(4):299–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19067533>
26. Ceriello A, Motz E. Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2018 May 15];24(5):816–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14976002>
27. McLellan KCP, Barbalho SM, Cattalini M, Lerario AC. Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. *Rev Nutr* [Internet]. 2007 Oct [cited 2018 May 15];20(5):515–24. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732007000500007&lng=pt&tlng=pt
28. Abrantes A, Isabel Pereira Laginhas Loureiro C. Title Procedimentos normalizados para pesquisa de informação clínica sobre reacções adversas no âmbito da infecção VIH/SIDA. 2009 [cited 2018 May 15]; Available from: [https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/15008/1/Tese_mestradoAbrantesCatari na.pdf](https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/15008/1/Tese_mestradoAbrantesCatari%20na.pdf)
29. Monzillo LU, Hamdy O, Horton ES, Ledbury S, Mullooly C, Jarema C, et al. Effect of Lifestyle Modification on Adipokine Levels in Obese Subjects with Insulin Resistance. *Obes Res* [Internet]. 2003 Sep [cited 2018 May 15];11(9):1048–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12972674>
30. Wang G, Zhang L, Li Q. Genetic polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and NQO1 genes and diabetes mellitus risk in Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2006 Mar 10 [cited 2018 May 15];341(2):310–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413497>
31. Arnett DK, Claas SA. Omics of Blood Pressure and Hypertension. *Circ Res* [Internet]. 2018;122(10):1409–19. Available from: <http://circres.ahajournals.org/content/122/10/1409?etoc=>
32. Heerwagen MJR, Miller MR, Barbour LA, Friedman JE. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* [Internet]. 2010 Sep [cited 2018 May 15];299(3):R711–22. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00310.2010>
-

33. Moreira HG, Bezerra J, Sette C, Carolina L, Keiralla B, Gomes Alves S, et al. Diabetes mellitus, hipertensão arterial e doença renal crônica: estratégias terapêuticas e suas limitações. *Rev Bras Hipertens* [Internet]. 2008 [cited 2018 May 15];15(2):111–6. Available from: <http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/15-2/17-diabetes.pdf>
 34. Teng J, Dwyer KM, Hill P, See E, Ekinci EI, Jerums G, et al. Spectrum of renal disease in diabetes. *Nephrology* [Internet]. 2014 Sep [cited 2018 Mar 19];19(9):528–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24899354>
 35. American Diabetes Association. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care* [Internet]. 2018;41(Supplement 1):S1–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29222369><http://care.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/dc18-Sint01>
 36. Park CW. Diabetic Kidney Disease: From Epidemiology to Clinical Perspectives. *Diabetes Metab J* [Internet]. 2014 Aug [cited 2018 Mar 19];38(4):252. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25215271>
 37. de Boer IH, Rue TC, Hall YN, Heagerty PJ, Weiss NS, Himmelfarb J. Temporal Trends in the Prevalence of Diabetic Kidney Disease in the United States. *JAMA* [Internet]. 2011 Jun 22 [cited 2018 Apr 21];305(24):2532. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21693741>
 38. Lancet MC-T, 1998 undefined. Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. Elsevier [Internet]. [cited 2018 May 15]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673698013464>
 39. Jha JC, Jandeleit-Dahm KAM, Cooper ME. New insights into the use of biomarkers of diabetic nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis* [Internet]. 2014 May 1 [cited 2018 May 15];21(3):318–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24780461>
 40. Macisaac RJ, Ekinci EI, Jerums G. Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2014;63(2 SUPPL.2):S39–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2013.10.048>
 41. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care*
-

- [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2018 May 16];28(1):164–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616252>
42. Of OJOS, Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl* [Internet]. 2013 [cited 2018 May 16];3(1):4–4. Available from: <http://www.kidney-international.org>
 43. Boddana P, Caskey F, Casula A, Ansell D. UK Renal Registry 11th Annual Report (December 2008): Chapter 14 UK Renal Registry and international comparisons. *Nephron Clin Pract* [Internet]. 2009 [cited 2018 Mar 19];111(1):c269–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19542702>
 44. Bruno RM, Gross JL. Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6-year follow-up study. *J Diabetes Complications* [Internet]. [cited 2018 Mar 19];14(5):266–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113689>
 45. Lugon JR. End-stage renal disease and chronic kidney disease in Brazil. *Ethn Dis* [Internet]. 2009 [cited 2018 Mar 19];19(1 Suppl 1):S1-7–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19484865>
 46. (Adaptado de BRENNER e RECTOR 2000). Glomerulopatias Secundárias. *J Bras Nefrol*. 2005;XXVII n^o1(Dm):32–4.
 47. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: Global dimension and perspectives. *Lancet* [Internet]. 2013 Jul 20 [cited 2018 May 16];382(9888):260–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727169>
 48. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2018 May 16];264(3):224–36. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2796.2008.01981.x>
 49. Connell JMC, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol*. 2005;186(1):1–20.
 50. Sanjuliani AF, Torres MRSG, Paula LN, Bassan FB. Eixo Renina-angiotensina-aldosterona: Bases Fisiológicas e Fisiopatológicas. *Rev do Hosp Univ Pedro Ernesto* [Internet]. 2011;10:20–30. Available from: http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=90
-

51. Fine G, Osamura RY, Lee MW. Ultrastructure of the myocardial fibroma. *Arch Pathol Lab Med*. 1979;103(1):11–7.
 52. American Society of Biological Chemists., Rockefeller Institute for Medical Research., American Society for Biochemistry and Molecular Biology. *The Journal of biological chemistry*. [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; [cited 2018 Mar 12]. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/content/short/268/13/9496>
 53. Balyasnikova I V, Karran EH, Albrecht RF, Danilov SM. Epitope-specific antibody-induced cleavage of angiotensin-converting enzyme from the cell surface. *Biochem J* [Internet]. 2002;362(Pt 3):585–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1222422/>
 54. Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med*. 2008;86(6):615–21.
 55. Siragy HM, Carey RM. Role of the intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2010;31(6):541–50.
 56. Ruiz-Ortega M, Esteban V, Rupérez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Carvajal G, et al. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: Role of angiotensin II [Internet]. Vol. 15, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2006 [cited 2018 May 16]. p. 159–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16481883>
 57. McAllister AS, Atkinson AB, Johnston GD, McCance DR. Endothelial function in offspring of Type 1 diabetic patients with and without diabetic nephropathy. *Diabet Med* [Internet]. 1999 Apr [cited 2018 Mar 19];16(4):298–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10220203>
 58. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* [Internet]. 1986 Jun 1 [cited 2018 Mar 19];77(6):1925–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3011862>
 59. Thompson & Thompson. *Genética Médica – 6° edição*. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ. 2002. Pág. 76-82. 2002;
 60. Krieger JE. *Bases moleculares das doenças cardiovasculares: a integração entre a pesquisa e a prática clínica*. Krieger JE, editor. Atheneu; 2008. 600 p.
-

61. Bao W, Hu FB, Rong S, Rong Y, Bowers K, Schisterman EF, et al. Predicting risk of type 2 diabetes mellitus with genetic risk models on the basis of established genome-wide association markers: a systematic review. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2013 Oct 15 [cited 2018 May 16];178(8):1197–207. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24008910>
 62. Rizvi S, Raza ST, Mahdi F. Association of genetic variants with diabetic nephropathy. *World J Diabetes* [Internet]. 2014 Dec 15 [cited 2018 May 16];5(6):809. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25512783>
 63. Doi Y, Yoshizumi H, Yoshinari M, Iino K, Yamamoto M, Ichikawa K, et al. Association between a polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene and microvascular complications in Japanese patients with NIDDM. *Diabetologia*. 1996;39(1):97–102.
 64. Ng DPK, Placha G, Choo S, Chia KS, Warram JH, Krolewski AS. A disease haplotype for advanced nephropathy in type 2 diabetes at the ACE locus. *Diabetes*. 2006;55(9):2660–3.
 65. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. 1990;86(4):1343–6.
 66. Cunha RDS, Vicente A, Ferreira L. Sistema renina-angiotensina-aldosterona e lesão vascular hipertensiva. *Rev Bras Hipertens*. 2000;7(3):282–92.
 67. Schmidt S, Schone N, Ritz E. Association of ACE gene polymorphism and diabetic nephropathy? *Kidney Int* [Internet]. 1995 [cited 2018 Jan 28];47:1176–81. Available from: [http://kidney-international.com/article/S0085-2538\(15\)58931-X/pdf](http://kidney-international.com/article/S0085-2538(15)58931-X/pdf)
 68. Mizuiri S; Hemmi H; Inoue A et al. Angiotensin-Converting Enzyme Polymorphism and Development of Diabetic Nephropathy in Non-Insulin-Dependent Diabetes mellitus. *Nepron*. 1995;70:444–59.
 69. Ohno T, Kawazu S, Tomono S. Association analyses of the polymorphisms of angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen genes with diabetic nephropathy in Japanese non-insulin-dependent diabetics. *Metabolism*. 1996;45(2):218–22.
 70. Fujisawa T, Ikegami H, Shen G-Q, Yamato E, Takekawa K, Nakagawa Y, et al.
-

Angiotensin I-Converting Enzyme Gene Polymorphism Is Associated With Myocardial Infarction, but Not With Retinopathy or Nephropathy, in NIDDM. *Diabetes Care*. 1995;18(7):983–5.

71. Pereira AC, Mota GFA, Cunha RS, Herbenhoff FL, Mill JG, Krieger JE. Angiotensinogen 235T allele “dosage” is associated with blood pressure phenotypes. *Hypertension*. 2003;41(1):25–30.
 72. Matsusaka T, Hymes J, Ichikawa I. Angiotensin in progressive renal diseases: theory and practice. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 1996 Oct [cited 2018 Mar 19];7(10):2025–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8915963>
 73. Bohrer MP, Deen WM, Robertson CR, Brenner BM. Mechanism of angiotensin II-induced proteinuria in the rat. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 1977 Jul [cited 2018 Mar 19];233(1):F13–21. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.1977.233.1.F13>
 74. Oh TG, Shin CS, Park KS, Kim SY, Cho BY, Lee HK, et al. Relationships between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism and renal complications in Korean IDDM patients. Vol. 11, *The Korean journal of internal medicine*. 1996. p. 133–7.
 75. Negulescu O, Bognar I, Lei J, Devarajan P, Silbiger S, Neugarten J. Estradiol reverses TGF- β 1-induced mesangial cell apoptosis by a casein kinase 2-dependent mechanism. *Kidney Int* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2018 Mar 11];62(6):1989–98. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815487666>
 76. Potier M, Elliot SJ, Tack I, Lenz O, Striker GE, Striker LJ, et al. Expression and regulation of estrogen receptors in mesangial cells: influence on matrix metalloproteinase-9. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2001;12(2):241–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158214>
 77. Fava S, Azzopardi J. ACE Gene Polymorphism as a Prognostic Indicator in Patients With Type 2 Diabetes and Established Renal Disease. *Diabetes Care* [Internet]. 2001 [cited 2017 Nov 18];24:2115–20. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/content/diacare/24/12/2115.full.pdf>
 78. Panagiotopoulos S, Aldred GP, Jacklin CJ. Angiotensin-Converting Ezyme (ACE) Gene Polymorphism in Type II Diabetic Patients With Increased Albumin Excretion Rate. *J Diabetes Complications*. 1995;9:272–6.
-

79. Dudley CRK, Keavney B, Stratton IM, Turner RC, Ratcliffe PJ. U.K. Prospective Diabetes Study XV: Relationship of renin-angiotensin system gene polymorphisms with microalbuminuria in NIDDM. *Kidney Int* [Internet]. 1995;48(6):1907–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1995.490>
 80. Solini A, Giacchetti G, Sfriso A, Fioretto P, Sardu C, Saller A, et al. Polymorphisms of angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen genes in type 2 diabetic sibships in relation to albumin excretion rate. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 1999;34(6):1002–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386\(99\)70004-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386(99)70004-1)
 81. Viswanathan V, Zhu Y, Bala K, Dunn S, Snehalatha C, Ramachandran A, et al. Association between ACE gene polymorphism and diabetic nephropathy in South Indian patients. *JOP* [Internet]. 2001;2(2):83–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11867868>
 82. Ergen AH, Hatemi H, Agachan B CH. Angiotensin-I converting enzyme gene polymorphism in Turkish type 2 diabetic patients. *Exp Mol Med*. 2004;36(4):345–50.
 83. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Carter A, Casey DC, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1459–544.
 84. Araz M, Aynacioglu S, Okan V, Akdemir I, Aktaran S. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and coronary heart disease in Turkish type 2 diabetic patients. *Acta Cardiol*. 2002;57(4):265–9.
 85. Higgins JPT, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ Br Med J* [Internet]. 2003 Sep 6 [cited 2018 May 1];327(7414):557–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12958120>
 86. REIS AA da S. Study on the association of genetic polymorphism in thyroid cancer Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2010;98.
 87. Parchwani DN, Kesari MG, Patel DD, Patel DJ. Influence of genetic variability at the ACE locus in intron 16 on Diabetic Nephropathy in T1DM patients. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2014;58(4):327–37.
-

88. Nuffield Trust by the Royal Society of Medicine Press. Cochrane AL. Effectiveness and Efficiency: Random Reflections on Health Services. London: Nuffield Provincial Hospitals Trust, 1972. Reprinted in 1989 in association with the BMJ. 1999.
 89. Sackett DL, Rosenberg WM, Gray JA, Haynes RB, Richardson WS. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. *BMJ* [Internet]. 1996 Jan 13 [cited 2018 May 18];312(7023):71–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8555924>
 90. Bakker K, Apelqvist J, Schaper NC, International Working Group on Diabetic Foot Editorial Board. Practical guidelines on the management and prevention of the diabetic foot 2011. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2012 Feb [cited 2018 May 18];28:225–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271742>
 91. Andrésdóttir G, Jensen ML, Carstensen B, Parving H-H, Rossing K, Hansen TW, et al. Improved Survival and Renal Prognosis of Patients With Type 2 Diabetes and Nephropathy With Improved Control of Risk Factors. *Diabetes Care* [Internet]. 2014 Jun [cited 2018 May 18];37(6):1660–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24623028>
 92. Bakker K, Apelqvist J, Lipsky BA, Van Netten JJ, Schaper NC. The 2015 IWGDF guidance documents on prevention and management of foot problems in diabetes: development of an evidence-based global consensus. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2016 Jan [cited 2018 May 18];32:2–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26409930>
 93. Jalil JE, Ocaranza MP. Genotypes of the renin-angiotensin-aldosterone system : on the search of cardiovascular diseases. 2002;55(2):89–91.
 94. Pugliese GBSSMHJOGDVFSMS. The 2015 IWGDF guidance documents on prevention and management of foot problems in diabetes: development of an evidence-based global consensus. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2016;32(30):13–23. Available from: <http://libweb.anglia.ac.uk/>
 95. José A, Luiz B. Meta-análise: Definição, aplicações e sinergia com dados espaciais. *Cad Ciência Tecnol.* 19, n.3:pag.407-428.
 96. Malta, M., Cardoso, L. O., Bastos, F. I., Magnanini, M. M. F. C., da Silva MFP. STROBE initiative: guidelines on reporting observational studies. *Rev Saúde Pública* [Internet]. 2010;44(3):559–65. Available from: www.scielo.br/rsp
 97. Haneda M, Utsunomiya K, Koya D, Babazono T, Moriya T, Makino H, et al. A new
-

classification of Diabetic Nephropathy 2014: a report from Joint Committee on Diabetic Nephropathy. *Clin Exp Nephrol*. 2015;19(1):1–5.

98. Greco T, Zangrillo A, Biondi-Zoccai G LG. Meta-analysis: pitfalls and hints. *Hear Lung Vessel*. 2013;5:19–25.
 99. Berwanger O, Suzumura EA, Buehler AM OJ. Como Avaliar Criticamente Revisões Sistemáticas e Metanálises ? *Rev Bras Ter Intensiva*. 2007;19:475–80.
 100. Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, Hamada Y, Ueda H, Shintani M, et al. Meta-analysis of association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme gene with diabetic nephropathy and retinopathy. *Diabetologia*. 1998;41(1):47–53.
 101. Young RP, Chan JC, AJH CJ, Poon E, Nicholls G, Cockram CS. Insertion / Deletion Polymorphisms Chinese Type 2 Diabetic Patients. 1998;21(3):431–8.
 102. Ng DPK, Tai BC, Koh D, Tan KW, Chia KS. Angiotensin-I converting enzyme insertion/deletion polymorphism and its association with diabetic nephropathy: A meta-analysis of studies reported between 1994 and 2004 and comprising 14,727 subjects. *Diabetologia*. 2005;48(5):1008–16.
 103. Yoshida H, Kuriyama S, Atsumi Y, Tomonari H, Mitarai T, Hamaguchi A, et al. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int*. 1996;50(2):657–64.
 104. Uddin M, Azam M, Chowdhury N, Akhteruzzaman S. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism in type 2 diabetic patients with nephropathy. *J Med Sci [Internet]*. 2007;7(4):682–5. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34250807102&partnerID=40&md5=10f2f9e39530179e74287b4c73d04b51>
 105. Patel HV, Kalia K, Mannari J. Angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphism increases the susceptibility of diabetic nephropathy in Western Indian Type 2 diabetic patients. *Int J Diabetes Dev Ctries*. 2011;31(4):223–8.
 106. Tomino Y, Makita Y, Shike T, Gohda T, Haneda M, Kikkawa R, et al. Relationship between polymorphism in the angiotensinogen, angiotensin-converting enzyme or angiotensin II receptor and renal progression in Japanese NIDDM patients. *Nephron*. 1999;82(2):139–44.
-

107. Hanyu O, Hanawa H, Nakagawa O, Tani N, Andou N, Aizawa Y, et al. Polymorphism of the Angiotensin I-Converting Enzyme Gene in Diabetic Nephropathy in Type I1 Diabetic Patients with Proliferative Retinopathy. *Ren Fail.* 1998;20(1):125–33.
 108. Shaker OG, Ismail MF, Ashour E, Yousif HM, Afify M, Gouda W. ACE gene polymorphism and serum ACE level with Progression of Nephropathy in Type 2 Diabetic Patients. *J Adv Chem.* 2014;9(3):2023–32.
 109. Fawwaz S, Balbaa M, Fakhoury H, Borjac J, Fakhoury R. Association between Angiotensin-converting Enzyme Insertion/Deletion Gene Polymorphism and End-stage Renal Disease in Lebanese Patients with Diabetic Nephropathy. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2017;28(2):325–9.
 110. Nikzamir AR, Golmohamadi T, Nakhjavani M, Zahraei M, Amirzargar AA. Angiotensin Converting Enzyme Gene Polymorphism in Iranian Patients with Type 2 Diabetes. *Iran Journal Immunol.* 2006;3(1):23–9.
 111. Palomo-Pinon S, Gutierrez-Rodriguez ME, Daz-Flores M, Sanchez-Barrera R, Valladares-Salgado A, Utrera-Barillas D, et al. DD genotype of angiotensin-converting enzyme in type 2 diabetes mellitus with renal disease in Mexican Mestizos. *Nephrology.* 2009;14(2):235–9.
 112. He L, Xiong D-H, Liu Y, Zhang F, Robert R, Recker RR, et al. Association study of the oestrogen signalling pathway genes in relation to age at natural menopause. *J Genet.* 2007;86(3):269–76.
 113. Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC, Brosnihan KB. Estrogen Regulation of Angiotensin-Converting Enzyme mRNA. *Hypertension [Internet].* 1999;33(1):323–8. Available from: <http://hyper.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.HYP.33.1.323>
 114. Rogers JL, Mitchell AR, Maric C, Sandberg K, Myers A, Mulroney SE, et al. Sex Differences in Renal and Cardiovascular Function : Effect of sex hormones on renal estrogen and angiotensin type 1 receptors in female and male rats. 2007;20057:794–9.
 115. Ezzidi I MN, M K, M C, M. M. Identification of specific angiotensin-converting enzyme variants and haplotypes that confer risk and protection against type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009;25:717–24.
 116. Felehgari V, Rahimi Z, Mozafari H, Vaisi-Raygani A. ACE gene polymorphism and
-

serum ACE activity in Iranians type II diabetic patients with macroalbuminuria. *Mol Cell Biochem.* 2011;346(1–2):23–30.

117. Al-Harbi EM, Farid EM, Gumaa KA, Masuadi EM, Singh J. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and T2DM in a case-control association study of the Bahraini population. *Mol Cell Biochem.* 2011;350(1–2):119–25.
 118. Boright AP, Paterson AD, Mirea L, Bull SB, Mowjoodi A, Scherer SW, et al. Genetic variation at the ACE gene is associated with persistent microalbuminuria and severe nephropathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC Genetics Study. *Diabetes* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2018 Mar 11];54(4):1238–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15793268>
 119. Bhaskar LV, Mahin S, Ginila RT, Soundararajan P. Role of the ACE ID and PPARG P12A Polymorphisms in Genetic Susceptibility of Diabetic Nephropathy in a South Indian Population. *Nephrourol Mon* [Internet]. 2013;5(3):813–7. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3830907&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.numonthly.com/?page=article&article_id=9573%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24282791%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender
 120. Ahluwalia TS, Ahuja M, Rai TS, Kohli HS, Bhansali A, Sud K, et al. ACE variants interact with the RAS pathway to confer risk and protection against type 2 diabetic nephropathy. *DNA Cell Biol.* 2009;28(3):141–50.
-