

TESI DOCTORAL

**INFLUÈNCIA DE GENS DEL SISTEMA RENINA-  
ANGIOTENSINA SOBRE LA INSTAURACIÓ I  
PROGRESSIÓ DE LA NEFROPATIA I LA  
MORTALITAT EN DIÀLISI DE PACIENTS  
DIABÈTICS DE TIPUS 2**

**Ariadna Padró i Miquel**

octubre de 2009

Sota la direcció del Dr. Pedro Alfà Ramos

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR



Pedro Alía Ramos, doctor en Ciències Biològiques, facultatiu especialista en Bioquímica Clínica i cap de secció de l'Àrea de Bioquímica i Biologia Molecular del Laboratori Clínic, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona

CERTIFICO: Que la tesi ***influència de gens del sistema renina-angiotensina sobre la instauració i progressió de la nefropatia i la mortalitat en diàlisi de pacients diabètics de tipus 2***, de la qual és autora Ariadna Padró i Miquel, ha estat realitzada sota la meva direcció al Laboratori Clínic de l'Hospital Universitari de Bellvitge, per optar al grau de doctora en Bioquímica i Biologia Molecular, i que es troba en condicions de ser defensada davant del tribunal corresponent.

L'Hospitalet de Llobregat, 20 d'octubre de 2009

Dr. Pedro Alía Ramos



*Al pare, a la mare  
al Gerard i al Xavier*



# AGRAÏMENTS

Vull fer palès el meu agraïment al Dr. Pedro Alía Ramos, director d'aquesta tesi, per les facilitats donades, pel seu encoratjament, per tot el que m'ha ensenyat i pel que m'ensenyarà, per la seva disponibilitat, la seva paciència i per haver confiat en mi.

El Dr. Miguel Ángel Navarro Moreno ha estat una persona clau en el desenvolupament d'aquesta tesi. Des d'un principi em va acollir a la secció que dirigia, em va motivar amb la publicació de treballs relacionats amb la tesi i va trobar l'equilibri perfecte entre exigència i confiança. Em sento una privilegiada d'haver pogut treballar amb ell.

La col·laboració de la Dra. M<sup>a</sup> Teresa González Álvarez ha estat valuosíssima i imprescindible. M'admira la seva gran capacitat de treball i el seu caràcter afable i resolutiu. Li agraeixo enormement que hagi cregut en els projectes d'investigació interdisciplinaris i espero poder seguir gaudint d'una col·laboració tan distingida en el futur.

Agraeixo la concessió de la beca de l'Hospital Universitari de Bellvitge – IDIBELL de l'any 2008, fet que m'ha permès avançar el doctorat amb rapidesa.

A tot l'equip d'infermeria de l'Àrea de Bioquímica i Biologia Molecular (Pili, M. Teresa, Juanjo, Elena i Antonio) i a la Dra. Pilar Rosel us volia agrair tot el que m'heu ensenyat: des de la primera PCR fins a estar sempre de bon humor sense deixar de treballar amb una professionalitat excel·lent.

A la resta d'especialistes, infermers i tècnics del Laboratori Clínic volia agrair-los la bona predisposició a transmetre'm els seus coneixements; un agraïment especial li dec al Dr. Xavier Fuentes i Arderiu per obrir-me les portes del món científic amb la meva primera publicació. També vull agrair al Dr. Josep M. Ramon Torrel, cap del Servei de Medicina Preventiva, el temps que ha dedicat a donar-me encertats consells d'estadística.

Durant la residència a l'Hospital Universitari de Bellvitge he tingut companys meravellosos. Us vull donar les gràcies a tots, i molt especialment a la Bea, la Gemma, la Macarena, la Mariona i la Roser per les confidències, complicitats i moments tan bons compartits durant tots aquests anys.

Dec un agraïment molt especial a la meva família pel suport que m'ha donat sempre. Al Gerard agraeixo que m'hagi fressat el camí cap a l'exigència i l'esforç i que hagi estat sempre present tot i trobar-se tan lluny. Als meus pares agraeixo els valors que m'han transmès i l'esforç titànic que han dut a terme per convertir-me en el que sóc. Mai podré arribar a agrair-vos tant com mereixeu tot el que heu fet per mi. Finalment, he d'agrair al Xavier que em contamini diàriament amb l'alegria de viure, que hagi cregut fermament en les meves capacitats i, en definitiva, que sigui el millor del viatge que m'ha portat fins aquí.





# ÍNDIX

<b>Agraïments</b> .....	<b>I</b>
<b>Índex</b> .....	<b>III</b>
<b>Sigles i abreviatures</b> .....	<b>V</b>
<b>Resum de la tesi</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 DIABETIS MELLITUS I LES SEVES COMPLICACIONS</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2 NEFROPATIA DIABÈTICA</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 Definició i diagnòstic .....	4
1.2.2 Epidemiologia.....	5
1.2.3 Factors de risc.....	6
1.2.4 Mecanismes moleculars.....	6
1.2.4.1 Fisiologia del sistema renina-angiotensina .....	7
1.2.5 Progressió .....	9
1.2.5.1 Classificació dels estadis de la insuficiència renal crònica .....	10
1.2.5.2 Tractament.....	11
<b>1.3 INSUFICIÈNCIA RENAL CRÒNICA TERMINAL</b> .....	<b>14</b>
1.3.1 Definició, indicació i tipus de tractament .....	14
1.3.1.1 Hemodiàlisi .....	14
1.3.1.2 Diàlisi peritoneal.....	14
1.3.2 Mortalitat en diàlisi .....	15
1.3.3 Epidemiologia de la insuficiència renal terminal i de la mortalitat en diàlisi .....	15
<b>1.4 SUSCEPTIBILITAT GENÈTICA DE LA NEFROPATIA EN ELS DIABÈTICS</b> .....	<b>17</b>
<b>1.5 GENS DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA</b> .....	<b>18</b>
1.5.1 Gen de l'enzim convertidor d'angiotensina 1 .....	18
1.5.2 Gen de l'enzim convertidor d'angiotensina I de tipus 2.....	19
1.5.3 Gen de l'angiotensinogen .....	21
1.5.4 Gen del receptor d'angiotensina II de tipus 1.....	22
<b>2. HIPÒTESI I OBJECTIUS</b> .....	<b>25</b>
<b>3. MATERIAL I MÈTODES</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1 PACIENTS I RECOLLIDA DE DADES</b> .....	<b>31</b>
3.1.1 Mortalitat en diàlisi .....	31
3.1.2 Progressió de la nefropatia .....	32
3.1.3 Susceptibilitat a la nefropatia .....	34
<b>3.2 CRITERIS D'AVUACIÓ DE LA PROGRESSIÓ DE LA NEFROPATIA</b> .....	<b>35</b>
<b>3.3 CRITERI D'AVUACIÓ DE L'EFECTE CONJUNT DELS POLIMORFISMES</b> .....	<b>38</b>
<b>3.4 MÈTODES</b> .....	<b>40</b>
3.4.1 Esquema general .....	40
3.4.2 Extracció de DNA.....	40
3.4.3 PCR.....	41
3.4.3.1 PCR-RFLP.....	41
3.4.3.2 PCR a temps real amb sondes al·lel-específiques .....	45
3.4.3.3 PCR a temps real amb corbes de dissociació .....	49
3.4.4 Procediments de mesura emprats .....	51

3.4.5 Estadística i programes informàtics.....	52
3.4.5.1 Anàlisi de la supervivència.....	52
3.4.5.2 Regressió lineal múltiple.....	53
3.4.5.3 Regressió logística binària múltiple.....	53
3.4.6 Adreces d'Internet.....	54
<b>4. RESULTATS.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1 MORTALITAT EN DIÀLISI.....</b>	<b>58</b>
4.1.1 Descripció de la població.....	58
4.1.2 Corbes de supervivència.....	59
4.1.3 Regressions de Cox.....	62
4.1.3.1 Models univariants.....	62
4.1.3.2 Regressions independents per cada polimorfisme.....	63
4.1.3.3 Regressions combinant polimorfismes.....	65
<b>4.2 PROGRESSIÓ DE LA NEFROPATIA.....</b>	<b>68</b>
4.2.1 Descripció de la població.....	68
4.2.2 Regressió lineal.....	70
4.2.2.1 Models univariants.....	70
4.2.2.2 Regressions independents per cada polimorfisme.....	71
4.2.2.3 Regressions combinant polimorfismes.....	76
4.2.2.4 Selecció segons l'MDRD inicial.....	79
4.2.3 Anàlisi de la supervivència: regressions de Cox.....	85
4.2.3.1 Models univariants.....	85
4.2.3.2 Regressions independents per cada polimorfisme.....	87
4.2.3.3 Regressions combinant polimorfismes.....	90
<b>4.3 INSTAURACIÓ DE LA NEFROPATIA.....</b>	<b>92</b>
<b>4.4 CARACTERÍSTIQUES METROLÒGIQUES.....</b>	<b>96</b>
<b>5. DISCUSSIÓ.....</b>	<b>97</b>
<b>6. CONCLUSIONS.....</b>	<b>123</b>
<b>7. ANNEX.....</b>	<b>125</b>
A. Fórmula del decrement relatiu anual de la VFG.....	129
B. Regressions lineals múltiples mesurant la progressió de la nefropatia amb la concentració de creatinini en el plasma.....	130
C. Regressions de Cox: temps necessari per doblar la concentració de creatinini en el plasma.....	139
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>141</b>

## SIGLES I ABREVIATURES

<b>ACE1</b>	gen que codifica per l'enzim convertidor d'angiotensina I o peptidil-dipeptidasa A
<b>ACE2</b>	gen que codifica per l'enzim convertidor d'angiotensina I de tipus 2
<b>AGT</b>	gen que codifica per l'angiotensinogen
<b>AGTR1</b>	gen que codifica pel receptor d'angiotensina II de tipus 1
<b>ARAI</b>	Antagonista del Receptor d'Angiotensina II
<b>AUC</b>	àrea sota la corba. De l'anglès: area under the curve. Terme equivalent a la integral de la corba
<b>cDNA</b>	DNA còpia. De l'anglès copy DNA.
<b>dif relat</b>	diferència relativa
<b>DNA</b>	àcid desoxiribonucleic. De l'anglès: Deoxyribonucleic Acid
<b>dNTPs</b>	trifosfodesoxiribonucleòtids
<b>IC95%</b>	interval de confiança del 95%
<b>IECA</b>	Inhibidor de l'Enzim Convertidor d'Angiotensina (peptidil-dipeptidasa A)
<b>IMC</b>	Índex de Massa Corporal
<b>MDRD</b>	de l'anglès: Modification of Diet in Renal Disease
<b>IDMS</b>	de l'anglès: Isotopic Dilution Mass Spectrophotometry method
<b>mRNA</b>	àcid ribonucleic missatger. De l'anglès: Messenger Ribonucleic Acid
<b>n</b>	nombre d'individus
<b>NCBI</b>	de l'anglès: National Center for Biotechnology Information
<b>NKF-KDOQI</b>	American National Kidney Foundation - Kidney Disease Outcome Quality Initiative
<b>pb</b>	parells de bases
<b>PCR</b>	reacció en cadena de la polimerasa. De l'anglès: Polymerase Chain Reaction
<b>ppm</b>	persones per milió de població
<b>RAS</b>	sistema renina-angiotensina. De l'anglès: Renin-Angiotensin System
<b>RFLP</b>	fragments de restricció de longitud polimòrfica. De l'anglès: Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>rs</b>	de l'anglès: reference SNP. Numeració característica i individual que rep cada polimorfisme

<b>SNP</b>	polimorfismes d'un sol nucleòtid. De l'anglès: Single Nucleotide Polymorphism
<b>Th</b>	temperatura d'hibridació
<b>Tm</b>	temperatura de dissociació o fusió. De l'anglès: melting temperature
<b>URF</b>	unitats relatives de fluorescència
<b>VFG</b>	velocitat de filtració glomerular

NOTA: les magnituds bioquímiques i hematològiques que apareixen en aquesta tesi, s'han expressat seguint les recomanacions emeses per la Unió Internacional de Química Pura i Aplicada (IUPAC) i la Federació Internacional de Química Clínica (IFCC).

## RESUM DE LA TESI

Aquesta tesi s'ha centrat en l'estudi de la influència genètica sobre diversos aspectes de la nefropatia. Concretament, hem estudiat la relació de 6 polimorfismes de gens del sistema renina-angiotensina amb la progressió de la nefropatia, i amb la mortalitat en diàlisi de pacients diabètics de tipus 2. També s'ha inclòs un estudi preliminar que explora la relació entre els polimorfismes i la instauració de la nefropatia.

La classificació genotípica dels pacients s'ha dut a terme mitjançant la tècnica de PCR-RFLP o bé PCR a temps real. S'han genotipat els següents polimorfismes: I/D del gen que codifica per l'enzim convertidor d'angiotensina I o peptidil-dipeptidasa A (*ACE1*), p.M235T del gen que codifica per l'angiotensinogen (*AGT*), g.1166A>C del gen que codifica pel receptor d'angiotensina II de tipus 1 (*AGTR1*), c.186+2053G>A, c.439+4C>T i c.1542-361C>G del gen que codifica per l'enzim convertidor d'angiotensina I de tipus 2 (*ACE2*). Els polimorfismes del gen de l'*ACE2* no havien estat mai estudiats en la progressió de la nefropatia ni en la mortalitat en diàlisi. Totes les anàlisis estadístiques es van dur a terme de forma individual per a cada polimorfisme i també de forma conjunta per avaluar possibles interaccions entre ells.

La influència dels polimorfismes sobre la mortalitat en diàlisi s'ha estudiat mitjançant una anàlisi de la supervivència amb models de regressió de Cox multivariant amb 100 pacients diabètics de tipus 2 que havien iniciat tractament amb diàlisi al nostre centre hospitalari. A la regressió de Cox individual de cada polimorfisme, l'I/D de l'*ACE1* i el p.M235T de l'*AGT* van presentar efectes significatius sobre la mortalitat. Concretament el genotip DD va explicar un augment del risc de mortalitat de 3,5 (1,3 – 9,9) vegades el dels pacients II, i el genotip MM al seu torn va explicar un augment del risc de mortalitat de 3,8 (1,2 – 12,4) vegades el dels pacients TT. En l'estudi conjunt dels polimorfismes es va observar que el nombre d'al·lels **D** (I/D), **M** (p.M235T) i **G** (c.186+2053G>A) que tenia un pacient determinava de forma estadísticament significativa un increment del risc de morir: el risc relatiu de morir augmentava 1,5 vegades (IC 95% 1,2-1,9  $p=0,002$ ) per cada al·lel de risc de més que tenia el pacient. És a dir, els pacients amb els sis al·lels de risc tenien una probabilitat de morir 11 vegades superior als que no en tenien cap.

La influència dels polimorfismes sobre la progressió de la nefropatia una vegada ja establerta es va estudiar mitjançant models de Cox i de regressió lineal multivariant amb 320 pacients diabètics de tipus 2 diagnosticats d'insuficiència renal crònica d'estadis 1-3. A falta d'un únic criteri universal per avaluar la progressió, nosaltres en vam utilitzar 7 de diferents. Les conclusions a les quals es va arribar amb els diferents

critèris no van ser mai contradictòries encara que sí que diferien en la significació estadística adjudicada als polimorfismes. Vam proposar l'ús del pendent de la velocitat de filtració glomerular estimada mitjançant la fórmula MDRD-IDMS, basant-nos en una relació estadísticament més significativa entre aquest criteri i l'excreció diària de proteïna en orina, la variable que bibliogràficament més s'ha relacionat amb la progressió de la nefropatia. Pel que fa a l'estudi individual dels polimorfismes, es va observar una relació estadísticament significativa entre el pendent de disminució d'MDRD i els polimorfismes p.M235T de l'AGT, c.186+2053G>A i c.1542-361C>G de l'ACE2 –els dos darrers únicament en els homes–. És remarcable destacar que aquesta relació va ser encara més intensa quan es va realitzar l'estudi amb els pacients que presentaven una velocitat de filtració glomerular encara conservada ( $> 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) a la primera visita, és a dir, d'estadis 1-2 d'insuficiència renal crònica. Amb aquests pacients, l'estudi conjunt dels polimorfismes va mostrar que la combinació d'al·lels que millor estimava la progressió de la nefropatia era la formada per **D** (I/D), **M** (p.M235T) i **A** (c.186+2053G>A). Per cada al·lel de risc addicional, el pendent d'MDRD variava  $-0,86$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup> anualment ( $p=0,0005$ ). És a dir, el fet de tenir els 6 al·lels de risc respecte no tenir-ne cap, explicava una pèrdua anual de la velocitat de filtració glomerular de  $-5,2$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>. En els homes, aquesta relació va resultar ser encara més significativa.

Finalment, la influència dels polimorfismes sobre l'establiment de la nefropatia es va estudiar mitjançant models de regressió logística multivariant amb 227 casos i 69 controls. No es va poder evidenciar cap efecte genètic en la instauració de la nefropatia.

En resum, els resultats presentat en aquesta tesi posen de manifest que els polimorfismes I/D del gen *ACE1*, p.M235T de l'AGT, c.186+2053G>A i en menor importància c.1542-361C>G del gen *ACE2* influeixen en la mortalitat dels pacients diabètics de tipus 2 en diàlisi i en la progressió de la nefropatia una vegada ja està establerta, i que els polimorfismes implicats actuen conjuntament per produir l'efecte final. Per contra, no hem pogut demostrar que estiguin relacionats en la susceptibilitat a desenvolupar la nefropatia.

# **1. INTRODUCCIÓ**





## 1.1 DIABETIS MELLITUS I LES SEVES COMPLICACIONS

La diabetis mellitus és un trastorn crònic de base genètica caracteritzat per tres tipus de manifestacions:

- a) una síndrome metabòlica que consisteix en hiperglucèmia, glucosúria, polifàgia, polidípsia, poliúria i alteracions en el metabolisme dels lípids i de les proteïnes com a conseqüència d'un dèficit absolut o relatiu en la producció o l'acció de la insulina
- b) una síndrome vascular que pot ser macroangiopàtica o microangiopàtica, i que afecta tots els òrgans però especialment el cor, la circulació cerebral i perifèrica, els ronyons i la retina
- c) una síndrome neuropàtica que pot ser, al seu torn, autònoma o perifèrica.

La diabetis de tipus 2, coneguda anteriorment com a diabetis no insulíndependent o d'inici a l'edat adulta, és la forma més prevalent de diabetis i el risc de desenvolupar-la augmenta amb l'edat, l'obesitat i el sedentarisme. És el resultat de l'associació d'insulinoresistència i secreció deficient de la insulina.

Sol iniciar-se de forma progressiva després dels 40 anys, encara que en les darreres dècades ha existit un increment notable en persones més joves o inclús en nens, en els països desenvolupats.

Tal com recull Martínez en una revisió publicada recentment (1), s'han establert unes xifres mundials alarmants de diabetis per l'any 2030, on s'estima que 366 milions de persones patiran aquesta malaltia. En un estudi canadenc, s'ha observat un increment de la incidència de diabetis del 69% i de la prevalença del 27%, conjuntament amb una disminució de la taxa de mortalitat del pacient diabètic del 25%, entre els anys 1995 i 2005. Un estudi més optimista publicat l'any 2006 parla d'una tendència a l'estabilització de la pandèmia de diabetis mellitus que va començar als anys 80 als Estats Units. A Espanya, la distribució de la diabetis mellitus de tipus 2 no és uniforme i varia d'unes regions a altres. Actualment s'estima que entre el 10 i el 15% de la població adulta pateix diabetis (1). A Catalunya la diabetis s'estima en un 10,3% de la població, que es descompon en el 6,4% amb diabetis coneguda i el 3,9% restant que encara no ho sap (2).

Donat que com a mínim el 50% de totes les persones amb diabetis desconeix que té la malaltia (3), freqüentment la diabetis de tipus 2 roman sense diagnosticar i per tant sense tractament durant anys, degut al desenvolupament lent, l'absència de símptomes o la seva infravaloració. Aquesta circumstància sol ocasionar que els pacients ja tinguin complicacions cròniques en el moment del diagnòstic.

Les complicacions cròniques de la diabetis es classifiquen en tres grans grups: les macroangiopàtiques, que són una forma d'ateroesclerosi que afecta als grans vasos

(coronaris, cerebrovasculars i perifèrics), les microangiopàtiques, que inclouen la retinopatia i nefropatia diabètiques, i les neuropàtiques.

## 1.2 NEFROPATIA DIABÈTICA

### 1.2.1 Definició i diagnòstic

La denominació de nefropatia diabètica es reserva per la complicació microvascular secundària a la diabetis que afecta al glomèrul (glomeruloesclerosi difusa o nodular) i les arterioles (arterioloesclerosi). Altres afectacions renals de la diabetis són l'ateromatosi de les artèries renals i els seus grans vasos, la necrosi papil·lar, la pielonefritis i la uropatia obstructiva neurogènica.

La nefropatia diabètica es caracteritza per una fase inicial d'hipertròfia tant glomerular com tubular, seguida per un increment de l'excreció urinària d'albumina acompanyada per la pèrdua progressiva de la funció renal. En el període inicial hi ha augments del 20 al 50% en la velocitat de filtració glomerular (VFG). Paral·lelament, és característic un augment del flux sanguini renal, que pot ser normalitzat amb un bon control de la glucosa plasmàtica. La hipertròfia renal persisteix, a diferència d'altres nefropaties, fins a etapes d'insuficiència renal avançada.

El diagnòstic definitiu de nefropatia diabètica s'estableix mitjançant l'observació, en una biòpsia renal, de les lesions histològiques típiques. Com que la biòpsia és invasiva i dolorosa, a efectes pràctics s'assumeix que pateixen nefropatia diabètica els pacients diabètics amb una evolució de la malaltia superior als 10 anys, que estan diagnosticats d'insuficiència renal crònica. Es caracteritza per la presència d'albuminúria progressiva. Alguns autors afegeixen la presència de retinopatia com a requisit (4), encara que és sabut que un pacient pot desenvolupar en primer lloc nefropatia i posteriorment retinopatia: el risc de malaltia cardiovascular, retinopatia i altres complicacions de la diabetis és més alta en pacients amb nefropatia diabètica que en pacients diabètics sense malaltia renal (5). Per tal que el diagnòstic sigui més versemblant, cal descartar la presència d'altres malalties renals o alguna causa coneguda de pèrdua de proteïnes a l'orina com una infecció urinària.

La **insuficiència renal crònica es diagnostica** quan es troben valors patològics dels marcadors de deteriorament de la funció renal comentats més avall, o bé quan la velocitat de filtració glomerular és inferior a 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> durant més de tres mesos, independentment de la causa (6).

Els marcadors de deteriorament de la funció renal són la proteïnúria persistent (determinada pels valors patològics del quocient de les concentracions d'albumina/creatinini o proteïna/creatinini en dues de tres mostres d'orina puntual), anomalies en el sediment urinari i altres anomalies en estudis d'imatge. La velocitat de filtració glomerular és el millor estimador de la funció renal. Els valors normals de la filtració canvien en funció de l'edat, el sexe i la massa corporal. En adults joves és de 120 a 130 i va disminuint amb l'edat. Una VFG inferior a 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> representa una pèrdua de més de la meitat de la funció renal d'un adult. Per sota d'aquesta xifra, la prevalença de complicacions de la insuficiència renal crònica s'incrementa.

### **1.2.2 Epidemiologia**

La nefropatia és una de les complicacions més greus de la diabetis. Les dades epidemiològiques són molt més concretes pel que fa a la diabetis mellitus de tipus 1 que no pas per la de tipus 2, donat que aquesta darrera, de vegades, queda sense diagnosticar o bé resulta impossible establir una data d'inici de la diabetis i de la pròpia complicació renal.

En l'actualitat, el nombre de diabètics al món se situa al voltant dels 154 milions i es preveu que aquesta xifra es doblarà als propers 20 anys. La nefropatia es desenvolupa en aproximadament el 35% dels pacients amb diabetis mellitus (7). Per raons no ben conegudes, només determinats pacients pateixen complicacions renals, les quals solen tenir lloc relativament d'hora en el curs de la diabetis. La prevalença augmenta cada any a partir dels 10 anys (prevalença acumulada del 46% en homes i del 32% en dones) fins a arribar a un màxim al voltant dels 25 anys d'evolució. Un cop transcorregut aquest període sense aparició de nefropatia clínica, la probabilitat que es desenvolupi és molt baixa. El temps mitjà entre el diagnòstic de la diabetis i el primer signe de nefropatia –proteïnúria– és de 17 anys, encara que és extremadament variable.

Actualment, entre el 30-50% de les causes d'insuficiència renal crònica als països desenvolupats són atribuïbles a la diabetis mellitus i malalties vasculars (8). Els individus amb diabetis mellitus tenen un risc relatiu de presentar insuficiència renal 25 vegades superior que els individus que no en tenen (9).

Es preveu que l'epidèmia de diabetis mellitus de tipus 2 associada a obesitat contribuirà notablement a l'increment d'insuficiència renal crònica, encara que el control de la glucèmia i el tractament de la hipertensió, especialment mitjançant la inhibició del sistema renina-angiotensina (RAS), pot retardar l'aparició de la nefropatia diabètica i, una vegada establerta, disminuir la seva progressió (10).

### 1.2.3 Factors de risc

La relació causal de la hiperglucèmia en la gènesi de les complicacions cròniques de la diabetis és evident: els resultats del *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) han confirmat la importància de mantenir la concentració de glucosa en el plasma dins dels intervals de referència en la prevenció primària i secundària d'aquestes lesions (11). No obstant, alguns estudis epidemiològics revelen que prop del 60% dels pacients no desenvolupen complicacions renals independentment del grau de control de la glucèmia. Això significa que la glucosa no és l'única causa de les complicacions, sinó que altres factors també condicionen la gravetat i progressió de la malaltia.

Els factors de risc de desenvolupament de nefropatia en el pacient diabètic coneguts fins al moment són la hiperglucèmia, la hipertensió arterial, el sedentarisme, la obesitat, el tabaquisme, l'edat, les alteracions lipídiques, el temps transcorregut des de l'inici de la diabetis, les dietes amb excés de proteïnes, la susceptibilitat genètica i la raça (12).

### 1.2.4 Mecanismes moleculars

La hiperglucèmia –l'alteració de la via dels poliols porta a un excés de sorbitol intracel·lular– i l'elevació de la pressió arterial són els principals desencadenants de nefropatia en el pacient diabètic, juntament amb l'activació de l'**angiotensina II**. Com que la nefropatia no es desenvolupa en tots els pacients, factors ambientals i genètics participen també en el seu desenvolupament.

L'excés de glucosa circulant en plasma és responsable de la glicosilació no enzimàtica de proteïnes circulants i estructurals. Aquest procés és capaç d'induir hiperfiltració glomerular i incrementar la secreció de citocines i factors de creixement que provoquen l'engruiximent de la membrana basal glomerular.

La hiperglucèmia augmenta l'expressió de receptors de l'angiotensina II. La hiperfiltració que s'observa a la glomeruloesclerosi diabètica és conseqüència d'uns fluxos i pressions glomerular augmentats. L'origen resideix en alteracions vasomotores consistents en una vasodilatació de les arterioles glomerulars aferents i en un increment del to de l'arteriola eferent induït per l'angiotensina II. Com a conseqüència es produeix una hipertensió intraglomerular que indueix l'expansió de la matriu mesangial i la lesió glomerular.

D'altra banda, algunes molècules implicades en la patogènia de la lesió renal a la nefropatia del pacient diabètic, com la proteïna cinasa C, poden manifestar diverses isoformes, les quals, en funció de la seva diversitat i especificitat provocaran albuminúria i fibrosi renal, incrementant la presència de mediadors de l'activació intracel·lular. Nous estudis amb models animals suggereixen que la disfunció endotelial és el factor clau pel desenvolupament de la nefropatia (1).

#### **1.2.4.1 Fisiologia del sistema renina-angiotensina**

El **sistema renina-angiotensina** s'estimula per deshidratació, hemorràgia o disminució de la concentració plasmàtica d'ió sodi, tots ells causants d'hipovolèmia i per tant de reducció de la pressió arterial. La disminució de la pressió arterial estimula la secreció de **renina** (EC 3.4.23.15), a les cèl·lules juxtaglomerulars del corpuscle renal. Augmenta la concentració de renina plasmàtica, la qual mitjançant la seva acció proteasa actua sobre l'**angiotensinogen** –proteïna plasmàtica de 453 aminoàcids i d'origen hepàtic– escindint el decapeptid aminoterminal denominat **angiotensina I**.

En fluir la sang amb concentracions elevades d'angiotensina I pels capil·lars, sobretot els pulmonars, l'**enzim convertidor d'angiotensina I** (peptidil-dipeptidasa A, EC 3.4.15.1) transforma l'angiotensina I en **angiotensina II**, peptid de 8 aminoàcids, incrementant les concentracions plasmàtiques d'aquest darrer.

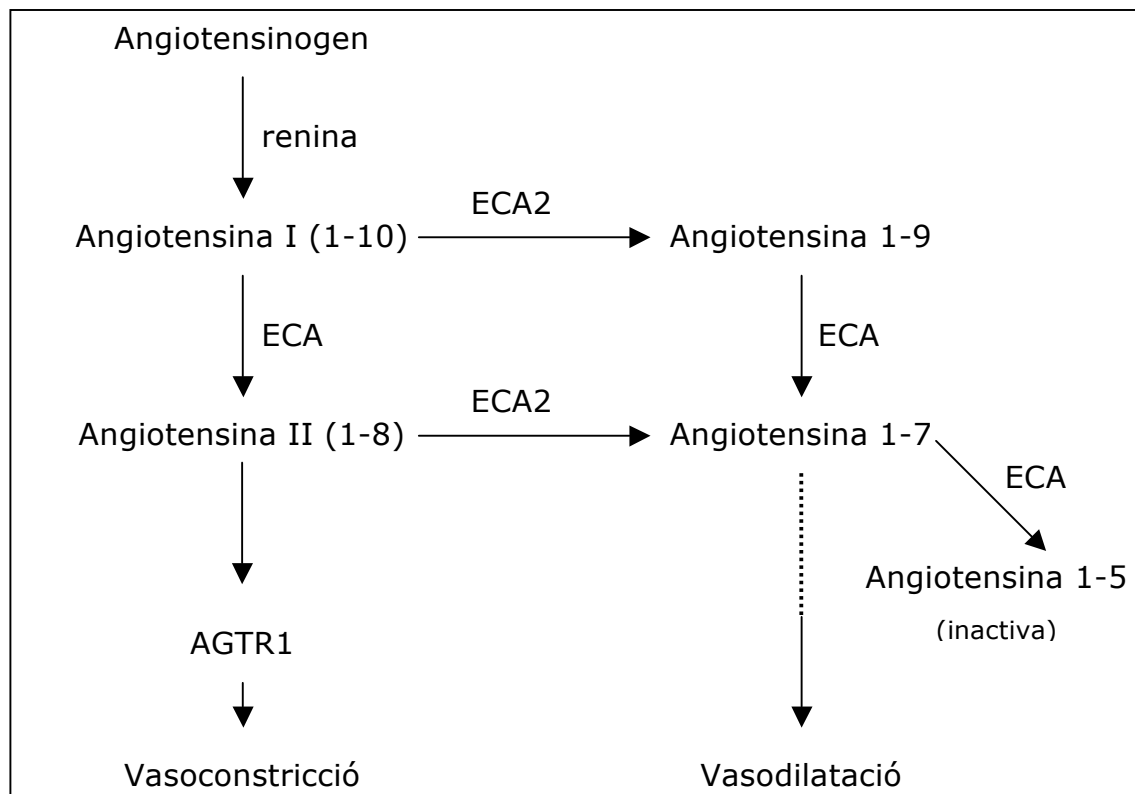
L'angiotensina II afecta la funció renal mitjançant quatre accions:

- a) Disminueix la velocitat de filtració glomerular per vasoconstricció de les arterioles aferents.
- b) Incrementa la reabsorció de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i aigua al túbul contornejat proximal per estimulació de l'activitat dels cotransportadors  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .
- c) Estimula l'escorça suprarenal per alliberar **aldosterona**, una hormona que estimula les cèl·lules principals dels conductes col·lectors amb la finalitat de reabsorbir més  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ . La conseqüència osmòtica de la menor excreció de  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  és una menor excreció d'aigua, el que incrementa el volum sanguini.
- d) Estimula l'alliberació de l'hormona antidiurètica o vasopressina, fet que incrementa la reabsorció d'aigua al conducte col·lector.

El sistema renina-angiotensina, però, és molt més complex del que es creia. Tipnis *et al.* (13) van descobrir un nou enzim: l'**enzim convertidor d'angiotensina I de tipus 2** (número EC no disponible (14)). Actua exclusivament com una carboxipeptidasa (15) i converteix l'angiotensina I en **angiotensina 1-9**, que té 9 aminoàcids. Mentre l'angiotensina II és un potent vasoconstrictor, l'angiotensina 1-9 no té cap efecte sobre

els vasos sanguinis, però pot ser convertida mitjançant la peptidil-dipeptidasa A en un pèptid més petit, l'**angiotensina 1-7**, el qual té activitat vasodilatadora (16). Gurley *et al.* (17) han suggerit que aquest enzim metabolitza també el pas d'angiotensina II a angiotensina 1-7, contribuint a la regulació de la pressió sanguínia (*figura 1*).

Aquestes troballes suggereixen que l'enzim convertidor d'angiotensina I de tipus 2 i els seus productes enzimàtics constitueixen un mecanisme clau en el balanç –pressor /depressor– del to vascular, i podrien protegir tant de malalties cardíaques com renals.



**Figura 1.** Esquema del sistema renina-angiotensina. Els mecanismes encara desconeguts estan marcats amb una línia de punts. ECA és l'enzim convertidor d'angiotensina (peptidil-dipeptidasa A), ECA2 és l'enzim convertidor d'angiotensina I de tipus 2, i AGTR1A és el receptor d'angiotensina II de tipus 1.

El procés pel qual l'angiotensina 1-7 executa la seva acció no està del tot establert. S'ha suggerit que aquesta molècula bloqueja l'acció de l'angiotensina II directament a través dels receptors d'angiotensina II de tipus 1 així com també de forma indirecta mitjançant altres vies metabòliques com per exemple bloquejant l'acció de la peptidil-dipeptidasa A (18).

Diversos estudis han assenyalat que el sistema renina-angiotensina sistèmic i/o intrarenal, representa un paper importantíssim en la patogènesi de la nefropatia diabètica (19, 20). La producció local d'angiotensina II incrementa la pressió intraglomerular mitjançant la constricció de les arterioles eferents i per tant contribueix

al desenvolupament i progressió de glomeruloesclerosi, observada en aquest tipus de nefropatia. També s'ha demostrat que l'angiotensina II és capaç d'estimular la producció de diverses citocines, com el TGF- $\beta$  i permet la sobreacumulació de proteïnes de la matriu extracel·lular (21).

Encara que el pacient diabètic presenta una disminució de l'activitat de la renina plasmàtica, s'ha demostrat que al ronyó existeix una hiperactivació del sistema renina-angiotensina (20). Aquesta hiperactivació local del sistema augmenta la concentració d'angiotensina II, que actua incrementant l'expressió de citocines, factors de creixement, estrès oxidatiu i la producció de col·lagen de tipus IV. Per tant, la hiperactivitat de l'angiotensina II amplifica els efectes de la hiperglucèmia i de la hipertensió. La importància del sistema renina-angiotensina pel que fa a la patogènesi de la nefropatia en els pacients diabètics està, doncs, ben establerta.

### **1.2.5 Progressió**

L'elevació progressiva de la pressió arterial i la proteïnúria són els principals factors evitables que, juntament amb el control metabòlic, marcaran la progressió de la lesió renal. El control estricte de la pressió arterial i de la concentració de glucosa plasmàtica, el bloqueig del sistema renina-angiotensina i els canvis en l'estil de vida (deixar de fumar, reducció del pes corporal, etc) poden aconseguir que la malaltia renal crònica s'estabilitzi, és a dir que la velocitat de filtració glomerular s'aturi en un estadi particular i que es redueixi notablement la proteïnúria (22). En canvi, moltes altres vegades, la malaltia pot progressar ràpidament després de períodes relativament llargs d'estabilitat. És important destacar que si el pacient es troba entre els estadis 1 a 3 d'insuficiència renal crònica (vegeu el següent apartat) és quan millor respon al tractament farmacològic i a la prevenció dels factors de risc.

Els signes i símptomes de la insuficiència renal progressiva són similars als observats en altres causes d'insuficiència renal crònica, encara que, degut a la diabetis mellitus, presenten alguns trets propis. Així, cal tenir present l'ajust de la dosi d'insulina a mesura que es perd funcionalitat renal, la presència concomitant de cardiopatia i l'observació d'hipoaldosteronisme hiporeninèmic.

Com a conseqüència de l'edat més avançada i el desenvolupament accelerat d'arterioesclerosi, els pacients amb diabetis mellitus de tipus 2 poden presentar amb més freqüència que els pacients de tipus 1 altres malalties renals, que poden sobreafegir-se a la nefropatia diabètica.

### **1.2.5.1 Classificació dels estadis de la insuficiència renal crònica**

L'any 2002, l'American National Kidney Foundation (NKF) Kidney Disease Outcome Quality Initiative (KDOQI) va proposar la classificació dels diferents estadis d'insuficiència renal en funció únicament de la velocitat de filtració glomerular renal (23):

Estadi 1: VFG  $\geq 90$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>

Estadi 2: VFG entre 60 i 89 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>

Estadi 3: VFG entre 30 i 59 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>

Estadi 4: VFG entre 15 i 29 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>

Estadi 5: VFG  $< 15$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>

El ronyó es va deteriorant progressivament des de la nefropatia incipient (estadi 1), caracteritzada per hiperfiltració i hipertròfia, amb augment del flux plasmàtic renal i microalbuminúria, fins la insuficiència renal terminal (estadi 5), acompanyada en la major part de casos de signes i símptomes d'urèmia.

#### **1.2.5.1.1 Estimació de la velocitat de filtració glomerular**

El procediment de referència –*gold standard*– per la mesura de la velocitat de filtració glomerular és el càlcul de la depuració d'inulina, substància exògena la concentració plasmàtica de la qual es manté estable una vegada injectada a la sang, ja que no està sotmesa a filtració glomerular ni a processos de reabsorció o metabolització renal. Es tracta d'un procediment car, que requereix una infusió intravenosa i la recollida d'orina durant algunes hores, el que fa que aquest mètode no sigui aplicable a la pràctica clínica habitual.

El càlcul de la depuració de creatinini en orina de 24 hores va ser el més utilitzat històricament, però la variabilitat de l'excreció renal del creatinini, i la dificultat tècnica en la recollida de l'orina durant tot un dia, han portat a desestimar aquest càlcul, i preferir la determinació de la velocitat de filtració glomerular renal amb fórmules matemàtiques. Les més conegudes són la de Cockcroft-Gault publicada el 1976, i la d'MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) desenvolupada el 1999, a partir d'un estudi epidemiològic que ajusta la VFG a una superfície corporal de 1,73 m<sup>2</sup>.

L'*MDRD Study* va demostrar que la velocitat de filtració glomerular es podia estimar en insuficiència renal crònica emprant l'edat, el sexe, la raça (blanc o negre) i la concentració de creatinini, d'albumina i d'urea en sèrum. Una versió simplificada de l'MDRD – MDRD-4 – elimina les concentracions sèriques d'albumina i d'urea de



l'equació, perdent molt poca exactitud (24). Si el procediment de mesura emprat per mesurar la concentració plasmàtica de creatinini és traçable a un mètode de referència d'espectrometria de masses per dilució isotòpica, la fórmula de l'MDRD-4 s'ha d'utilitzar amb una modificació –el factor inicial que multiplica és diferent– i la nova fórmula s'anomena MDRD-IDMS (*Modification of Diet in Renal Disease with an Isotopic Dilution Mass Spectrophotometry method*).

#### **Fórmula MDRD-IDMS:**

$$\text{Velocitat de filtració glomerular (mL/min/1,73 m}^2\text{)} = \\ =175 \times (\text{Srm—Creatinini})^{-1,154} \times (\text{Edat})^{-0,203} \times (0,742 \text{ si és dona}) \times (1,210 \text{ si és de raça negra})$$

La concentració sèrica de creatinini ha de ser expressada en mg/dL i l'edat en anys.

Aquesta fórmula és idònia per l'estimació de la velocitat de filtració glomerular dels pacients que pateixen insuficiència renal. El principal inconvenient és que subestima la filtració glomerular a la població sana, i per aquest motiu només es considera patològic quan estima filtracions inferiors a 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> pertanyents al tercer estadi d'insuficiència renal crònica.

#### **1.2.5.2 Tractament**

En les fases inicials o amb insuficiència renal moderada el tractament es focalitza en el control de la pressió arterial (objectiu 130/80 mmHg), la reducció de la microalbuminúria, el control estricte de la glucèmia (Hb(San)—Hemoglobina A1c; fr.subst, calibratge DCCT/NGSP <7%), l'absència de tabaquisme, el control de la dislipèmia i el control de les infeccions urinàries (25).

Una vegada establerta la nefropatia, el control metabòlic estricte ja no sembla tan eficaç per evitar la seva progressió. El tractament concomitant d'altres complicacions com la hipertensió arterial, les infeccions urinàries, l'anèmia i la insuficiència cardíaca poden disminuir, encara que de forma temporal, el ritme de progressió de la nefropatia. Amb un tractament hipotensor precoç correcte, cal esperar una reducció del 50% de la probabilitat d'arribar a insuficiència renal crònica terminal als 8 anys.

Per tal de controlar la pressió arterial, a partir de l'any 1985 es va introduir el tractament amb inhibidors de l'enzim convertidor d'angiotensina I (IECA), que actuen fonamentalment disminuint la pressió intracapil·lar. S'ha comprovat que els IECA redueixen l'excreció urinària d'albúmina i alenteixen la reducció de la velocitat de filtració glomerular renal. L'estudi Heart Outcomes Prevention Evaluation, HOPE (26),

va demostrar que a igualtat de pressió arterial els IECA van aconseguir una disminució del 24% en la taxa de progressió a nefropatia establerta.

Posteriorment es van introduir els fàrmacs antagonistes dels receptors d'angiotensina II de tipus 1 (ARA-II), els quals redueixen la pressió arterial i aconsegueixen disminuir la taxa de progressió de microalbuminúria a proteïnúria. El tractament amb irbesartan (27) va aconseguir disminuir l'albuminúria un 38% respecte el grup control i després de 3 anys de seguiment, va reduir el risc de progressió a macroalbuminúria en un 70%. En pacients amb nefropatia establerta, els ARA-II són els fàrmacs antihipertensius que més redueixen el risc de progressió a insuficiència renal (28, 29). L'estudi RENAAL (Reduction of Endpoints in no-insulin dependent diabetes mellitus with the Angiotensin II Antagonist Losartan) es va dissenyar com un estudi multinacional, de doble cec i aleatori, on es va comparar l'efecte del losartan enfront d'un placebo, ambdues opcions combinades amb tractament antihipertensiu convencional excloent els IECA i altres ARA-II. Es van incloure un total de 1513 pacients de 28 països diferents. Van demostrar que el tractament amb losartan disminuïa l'excreció urinària de proteïnes un 35% i reduïa el risc d'insuficiència renal crònica terminal un 28% (30). Des d'un punt de vista econòmic, també reduïa substancialment els costos associats a la malaltia renal terminal en pacients diabètics (31).

L'augment de la concentració plasmàtica de potassi és l'efecte secundari més important dels antagonistes del sistema renina-angiotensina: la presenten l'1,5% dels pacients tractats amb algun d'aquests fàrmacs. (30, 32). La proporció pot ser molt més gran si els pacients presenten una insuficiència renal crònica avançada o bé si en el tractament es combinen fàrmacs antialdosterònics.

Des de la introducció dels ARA-II s'ha plantejat la hipòtesi que prescrits en combinació amb els IECA, podrien maximitzar la inhibició del sistema renina-angiotensina i reduir la proteïnúria de forma més efectiva (22). Les societats de nefrologia no havien arribat a cap consens per tal d'emetre una recomanació en aquest sentit, en part mogudes per la precaució a l'hora d'associar fàrmacs que retenen potassi de forma no controlada. Sembla però, que aquest debat quedarà finalment tancat després que s'hagin publicat els resultats de l'estudi ONTARGET (33). En aquest estudi han avaluat els canvis que es produeixen a la funció renal d'individus diabètics amb afectació en aquest òrgan, en funció d'un tractament amb un o dos fàrmacs inhibidors del sistema renina-angiotensina. Van participar un total de 25620 pacients als quals se'ls va assignar de forma aleatòria el tractament amb ramipril (IECA), telmisartan (ARA-II) o ambdós. Van concloure que als pacients amb elevat risc vascular, els efectes de telmisartan i de ramipril en monoteràpia sobre la funció renal eren similars, mentre que

la teràpia combinada, tot i reduir en major grau la proteïnúria, empitjorava de forma global les complicacions renals.

La prescripció dels dos fàrmacs en combinació en pacients diabètics s'hauria de limitar únicament a la presència de proteïnúria en absència de cap altra malaltia concomitant i sempre sota un estricte monitoratge de la concentració plasmàtica de potassi i de la funció renal (34).

Donada la necessitat de combinar diversos fàrmacs antihipertensius per tal d'aconseguir la reducció de la pressió arterial fins als objectius assenyalats, els fàrmacs que bloquegen el sistema renina-angiotensina s'han de contemplar necessàriament en el tractament d'aquests pacients. Altres fàrmacs antihipertensius que es poden emprar són: bloquejadors del canal de calci no dihidropiridines (verapamil, diltiazem),  $\beta$ -bloquejants i diürètics. Els inhibidors directes de la renina són un nou grup terapèutic que obre perspectives en el maneig de la hipertensió i la proteïnúria a la nefropatia (1).

És interessant també assenyalar que hi ha hagut diversos estudis encaminats a demostrar que l'eficàcia del tractament amb fàrmacs inhibidors del sistema renina-angiotensina depèn de polimorfismes genètics (35). Sembla ser que els IECA són particularment efectius als estadis de normoalbuminúria i microalbuminúria en pacients diabètics de tipus 2 que tenen el genotip II en el polimorfisme I/D del gen de l'enzim convertidor d'angiotensina (vegeu apartat 1.5.1), mentre que els pacients que tenen el genotip DD s'associen a una millor resposta a la teràpia amb els ARA-II en nefropatia establerta (36). Tot i això encara són necessaris més estudis prospectius per tal que la caracterització d'aquests polimorfismes sigui realment útil per decidir la millor teràpia en pacients amb diabetis i proteïnúria (37).

## **1.3 INSUFICIÈNCIA RENAL CRÒNICA TERMINAL**

### **1.3.1 Definició, indicació i tipus de tractament**

Quan els pacients arriben a insuficiència renal crònica d'estadi 5, corresponent a una velocitat de filtració glomerular estimada inferior a 15 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>, majoritàriament acompanyats de signes i símptomes d'urèmia, els nefròlegs han d'avaluar els beneficis, riscos i desavantatges de començar la teràpia substitutiva de ronyó. Certes complicacions de la insuficiència renal justifiquen l'inici de diàlisi en pacients als quals la filtració glomerular és superior als 15 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>, com per exemple hiperpotassèmia intractable, desnutrició relacionada amb la urèmia, disfunció neurològica d'origen urèmic, etc.

El tractament d'elecció és el trasplantament renal, i quan aquest no és possible, es duu a terme l'anomenat 'tractament renal substitutiu' que comprèn tècniques dialítiques que substitueixen parcialment la funció renal. Els dos tipus principals són l'hemodiàlisi i la diàlisi peritoneal.

#### **1.3.1.1 Hemodiàlisi**

L'hemodiàlisi és una tècnica de depuració extracorpòria en la qual es posa en contacte, a través d'una membrana semipermeable, la sang amb un líquid de diàlisi de característiques predeterminades. Supleix les funcions d'excreció de soluts, eliminació de líquid retingut i regulació de l'equilibri àcid-base i electrolític. L'acció té lloc gràcies a un mecanisme de difusió o transport per conducció i a ultrafiltració o transport per convecció. L'hemodiàlisi sol practicar-se 3 vegades per setmana durant 3-5 hores per sessió, depenent de la funció renal residual, la superfície corporal, la tècnica d'hemodiàlisi i els trastorns associats al pacient.

Les complicacions descrites inclouen la hipotensió, les rampes, el síndrome de desequilibri de diàlisi, les arítmies cardíaques i el dolor anginos, la reacció per pirògens, l'embòlia gasosa i el síndrome del primer ús entre d'altres.

#### **1.3.1.2 Diàlisi peritoneal**

A la diàlisi peritoneal, el peritoneu actua com a membrana semipermeable que separa, per una part, la sang dels capil·lars mesentèrics i, per l'altra, un líquid de característiques predeterminades que es renova periòdicament. Els mecanismes de transport mitjançant difusió i ultrafiltració actuen a través de la membrana peritoneal

per extreure soluts urèmics i aigua i aconseguir un equilibri àcid-base i electrolític. És una forma senzilla de practicar diàlisi domiciliària.

La principal complicació és la peritonitis.

### **1.3.2 Mortalitat en diàlisi**

Segons el Registre de Lombardia (38), les principals causes de mortalitat dels pacients diabètics que es troben sota un programa de diàlisi són: malalties cardiovasculars (50%), caquèxia (22%) i septicèmia (11%). En menor proporció també poden ser: càncer, hemorràgia gastrointestinal, fallada hepàtica, fallada respiratòria o suïcidi.

A la població general, els estudis conjunts Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC), Cardiovascular Health Study (CHS), Framingham Heart Study i Framingham Offspring Study (FOS), que va incloure 22634 individus, van demostrar que una velocitat de filtració glomerular estimada inferior a 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> s'associava a un major risc de patir episodis cardiovasculars (infart de miocardi, malaltia coronària greu, ictus i mort). Aquests pacients també van presentar un major risc de mortalitat total (7). Després d'estratificar per edat, raça i gènere, la mortalitat cardiovascular és entre 10 i 20 vegades superior en els pacients en diàlisi que en la població general (39).

Així doncs, la malaltia cardiovascular és la principal causa de mortalitat i morbiditat en els pacients en diàlisi. Comparant amb la població general, la mortalitat cardiovascular és de 10 a 20 vegades més alta en pacients amb diàlisi. La millora en la supervivència de pacients amb insuficiència renal durant les darreres dues dècades ha estat molt més accentuada en pacients trasplantats que no pas en pacients en diàlisi (40).

### **1.3.3 Epidemiologia de la insuficiència renal terminal i de la mortalitat en diàlisi**

La nefropatia és una de les complicacions més greus de la diabetis mellitus i s'associa a un increment del risc de mort prematura per malaltia cardiovascular. És la primera causa d'insuficiència renal terminal als països desenvolupats (25), amb un increment proporcional en les darreres dècades i amb previsió de seguir creixent en els propers anys. En l'actualitat, l'accés al tractament substitutiu, hemodiàlisi i trasplantament renal ha desplaçat a la insuficiència renal al tercer lloc com a causa de mort del pacient diabètic, després de la cardiopatia isquèmica i de l'accident vascular cerebral.

Els informes de la Organització Mundial de la Salut mostren que la malaltia renal és el número 12 de la llista de principals causes de mort en el món.

La prevalença d'insuficiència renal crònica a Espanya és de l'11%. El progressiu increment del nombre de pacients amb malaltia renal crònica i conseqüentment aquells subsidiaris de depuració extrarenal, estimat en un 5-8% anual, ha convertit aquesta malaltia en un problema sanitari social i econòmic de primer ordre per tots els sistemes sanitaris dels països desenvolupats. A Europa, el tractament amb diàlisi suposa al voltant del 2% del pressupost sanitari destinat a una població menor de l'1%. A Espanya, una anàlisi realitzada l'any 2000 estimava el cost anual d'un pacient en hemodiàlisi convencional en 26.676€ (7).

En els països desenvolupats, els pacients diabètics amb insuficiència renal terminal constitueixen el 40% dels individus en tractament substitutiu. I entre aquests, el 80% dels casos corresponen a diabetis mellitus de tipus 2 i la resta a diabetis mellitus de tipus 1.

Entre els pacients que requereixen diàlisi, aquells que tenen diabetis presenten un increment de la mortalitat del 22% al cap d'1 any i del 15% al cap de 5 anys, comparat amb els pacients que no tenen diabetis (25).

Segons el registre de la Sociedad Española de Nefrología, el 2002 hi havia 34.000 pacients amb insuficiència renal en tractament renal substitutiu a Espanya. La prevalença d'aquests pacients ha augmentat en els darrers anys, ja que era de 702 pacients/10<sup>6</sup> habitants al 1996 i va passar a 895 pacients/10<sup>6</sup> habitants al 2002. Aquest mateix any, el 21% de tots els casos d'insuficiència renal que van arribar a requerir tractament renal substitutiu va ser degut a diabetis mellitus (41).

A Catalunya, la prevalença de pacients amb DM en tractament renal substitutiu al 2004 va ser de 127,4 pacients/10<sup>6</sup> habitants i la incidència de 30,2 pacients/10<sup>6</sup> habitants (42). El nombre de persones diabètiques que van iniciar tractament renal substitutiu ha incrementat de 8,6 persones per milió de població (ppm) al 1994 a 32,4 ppm al 2003 (2). No només la morbiditat sinó també la mortalitat de pacients amb tractament renal substitutiu és pitjor entre els diabètics de tipus 2 que no pas entre els no diabètics.

## 1.4 SUSCEPTIBILITAT GENÈTICA DE LA NEFROPATIA EN ELS DIABÈTICS

Tal com s'ha esmentat amb anterioritat, només una part dels diabètics de tipus 2 desenvoluparan nefropatia.

Dues línies d'evidència suggereixen un fort component genètic en la susceptibilitat dels pacients diabètics a patir nefropatia. Per una banda, estudis epidemiològics indiquen que la prevalença de nefropatia diabètica creix durant els primers 15-20 anys després de l'inici de la diabetis, arribant llavors a un estancament que suggereix que només un grup de pacients són susceptibles al desenvolupament de la insuficiència renal. Això es contraposa a altres complicacions secundàries com la retinopatia, en la qual la prevalença continua creixent al llarg de tota la durada de la diabetis. D'altra banda, diversos estudis han demostrat que hi ha agrupació familiar dels pacients diabètics que pateixen nefropatia, suggerint la contribució genètica al risc del seu desenvolupament (43, 44).

Hi ha tres principals estratègies per identificar quins factors genètics determinen susceptibilitat a una malaltia. L'opció més simple és l'anomenada "*single gene approach*", és a dir, es mira l'associació amb un únic gen. La segona opció és l'anomenada "*candidate pathway-gene approach*" on es miren diversos gens que es troben dins d'una mateixa ruta metabòlica. I finalment una tercera possibilitat, la més innovadora de totes, és l'anomenada "*genome wide analysis*", és a dir, anàlisi de tot el genoma. D'aquesta manera, una gran diversitat de gens han estat apuntats com a possibles candidats (45, 46). Recentment s'han identificat diverses regions cromosòmiques que probablement contenen gens de susceptibilitat a nefropatia diabètica com són el gen de la carnosinasa 1 al cromosoma 18 (18q), el gen de l'adiponectina al cromosoma 3 (3q) i el gen responsable de la motilitat cel·lular al cromosoma 7 (7p) (47).

Els gens del sistema renina-angiotensina han pres una gran importància, donada l'evidència científica que adjudica a l'angiotensina II un paper en la hipertensió intraglomerular i la disminució de la progressió de la nefropatia quan aquest sistema s'inhibeix (vegeu 1.2.4.1).

## 1.5 GENS DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

Entre els gens del sistema renina-angiotensina, els que codifiquen per l'enzim convertidor d'angiotensina I, l'angiotensinogen, i el receptor d'angiotensina II de tipus 1 han estat àmpliament estudiats en la prevalença i progressió de nefropatia en els pacients diabètics, i en menys quantitat en la mortalitat. Recentment s'ha descrit un nou gen, que codifica per l'enzim convertidor d'angiotensina I de tipus 2, implicat en aquesta mateixa via metabòlica, que sembla que també podria representar un paper interessant en la nefropatia diabètica.

### 1.5.1 Gen de l'enzim convertidor d'angiotensina 1

El gen que codifica per l'enzim convertidor d'angiotensina I (*ACE1*) es troba al cromosoma 17 (17q23) i conté 26 exons.

L'enzim convertidor d'angiotensina I o peptidil-dipeptidasa A (EC 3.4.15.1) és una dipeptidilcarboxipeptidasa formada per 1278 aminoàcids que desenvolupa un important paper en la regulació de la pressió arterial i l'equilibri hidroelectrolític, hidrolitzant l'angiotensina I en angiotensina II, un pèptid estimulator de l'aldosterona i potent vasopressor. L'enzim també és capaç d'inactivar la bradicinina, un potent vasodilatador.

És un enzim que es troba àmpliament distribuït a tot l'organisme. El gen *ACE1* codifica per dos isoenzims. L'isoenzim somàtic s'expressa en molts teixits, incloent les cèl·lules de l'endoteli vascular, les de l'epiteli renal i les cèl·lules testiculars de Leydig, mentre que la isoforma testicular o germinal, només s'expressa en cèl·lules espermàtiques.

Tot i estar unit a la membrana de les cèl·lules de l'endoteli vascular, la peptidil-dipeptidasa A també circula en plasma. La seva concentració plasmàtica mostra variacions interindividuals: s'ha observat que hi ha individus que poden arribar a tenir-ne cinc vegades més que d'altres. En canvi, les variacions intraindividuals són mínimes (48).

Rigat *et al.*, van descriure un polimorfisme (g.11467\_11468ins(Alu), rs4646994) que consisteix en la inserció (I) o deleció (D) d'una seqüència repetitiva Alu de 289 parells de bases a l'intró 15 (49). Aquest polimorfisme es coneix internacionalment com a I/D de l'*ACE1*, i aquesta és la denominació que emprarem en aquesta tesi. Van trobar que aquest polimorfisme estava fortament associat a la concentració plasmàtica de l'enzim, de tal forma que els individus DD en tenien aproximadament el doble que els individus II, mentre que els heterozigots presentaven concentracions intermèdies (50). La



concentració renal de l'enzim també s'ha trobat augmentada en els individus amb genotip DD. Això suggereix que la inserció deu contenir una seqüència "silenciadora". Aquest polimorfisme ha estat àmpliament estudiat en tots els aspectes de la nefropatia en pacients diabètics i durant molts anys. El fet que els resultats presentats no sempre hagin estat coincidents explica la gran quantitat d'estudis en els quals s'ha avaluat el seu efecte.

Pel que fa a la susceptibilitat a la nefropatia diabètica, Staessen *et al.* (51) van ser els primers a presentar una associació positiva amb el genotip DD (odds ratio de 1,5), però posteriorment no ha estat sempre replicada (52).

Alguns treballs apunten que el genotip DD s'associa en major grau a la progressió de la nefropatia que no pas a la susceptibilitat (53): moltes publicacions adjudiquen a l'al·lel D un pitjor pronòstic de la nefropatia. Cal tenir en compte que els estudis no són homogenis en quan al criteri emprat per avaluar la progressió.

També existeix controvèrsia en els estudis que intenten predir la mortalitat en pacients en diàlisi: mentre que alguns conclouen que el polimorfisme I/D de l'ACE sembla no tenir relació en la prognòstic dels pacients en hemodiàlisi crònica (54), d'altres troben associacions significatives entre l'al·lel D i el risc de mortalitat en pacients en diàlisi (55, 56).

Tots els estudis coincideixen en el fet que l'al·lel I mai no constitueix cap risc ni de susceptibilitat, ni de progressió, ni de mortalitat d'aquests pacients; alguns conclouen que és protector mentre d'altres no troben cap efecte.

### **1.5.2 Gen de l'enzim convertidor d'angiotensina I de tipus 2**

El gen de l'enzim convertidor d'angiotensina I de tipus 2 (*ACE2*) es troba al cromosoma X (Xp22) i conté 18 exons. És de recent descobriment ja que va ser clonat per primera vegada a l'any 2000 (13). La proteïna que codifica, de 805 aminoàcids (57), s'expressa predominantment en cèl·lules de l'endoteli vascular del teixit cardíac, testicular i renal, i a tot el tracte gastrointestinal. Comparteix un 40% d'homologia amb la peptidil-dipeptidasa A, però difereix enormement en l'especificitat de substrat i la seva activitat no s'altera pels fàrmacs denominats IECAS.

L'RNAm de l'*ACE2* es troba sobreexpressat en pacients amb cardiomiopatia dilatada o isquèmica, suggerint que pot ser un important factor en la modulació de l'estructura cardíaca o de la seva funció (58). És per aquest motiu que bona part de la investigació s'ha centrat en la implicació dels polimorfismes d'aquest gen en la patologia cardíaca i en la mortalitat per episodis cardiovasculars.

Estudis experimentals amb ratolins sans han mostrat que la supressió del gen *ACE2* porta al desenvolupament de glomeruloesclerosi (59, 60) i que la inhibició farmacològica d'aquest enzim empitjora la nefropatia diabètica experimental (61). S'han fet també estudis clínics amb humans, el més significatiu dels quals és el presentat per Reich *et al.* (62). Comparen l'expressió gènica de l'*ACE2* en biòpsies renals de pacients diabètics de tipus 2 amb insuficiència renal, enfront de mostres control (provinents de pacients no diabètics i sense malaltia renal). Van observar que els pacients diabètics tenien un 50% menys d'expressió de mRNA del gen *ACE2* i de proteïnes tant al glomèrul com al túbul proximal, respecte als controls. Aquestes troballes han portat a fer hipòtesis on s'adjudica a l'*ACE2* un paper protector del ronyó, basant-se en el fet que una expressió reduïda del gen pot contribuir al desenvolupament i progressió de la nefropatia (63 – 66). Mizuiri *et al.* van observar una expressió molt superior d'*ACE2* en biòpsies renals de 20 pacients sans comparades amb les de 20 pacients amb nefropatia diabètica (67). Tot i això encara no s'ha pogut elucidar quins són els mecanismes responsables de la disminució de l'*ACE2*. Només hem trobat una publicació que explori el paper dels polimorfismes de l'*ACE2* a la nefropatia diabètica (68).

Fins al moment s'han descrit 317 SNP (single nucleotide polymorphism) pertanyents a aquest gen (NCBI, vegeu l'apartat 3.4.6), dels quals únicament 5 es troben en loci exònics. En aquesta tesi, s'ha inclòs l'estudi de tres d'aquests polimorfismes. La tria dels polimorfismes s'ha basat en que la freqüència al·lèlica minoritària fos superior al 30% –fet que permet esperar al voltant d'un 9% d'homozigots per l'al·lel minoritari–, que les variants fossin susceptibles de ser genotipades per la metodologia clàssica (PCR-RFLP) o bé mitjançant la tecnologia Taqman® (Applied Biosystems), i finalment que pertanyessin a tres haplotips diferents. Es van escollir els polimorfismes c.186+2053G>A, c.1542-361C>G i c.439+4C>T.

#### **rs4646124 (c.186+2053G>A)**

Aquest polimorfisme es troba al cromosoma X (Xp22.2), a la posició 13398479 (*reference assembly*, consulteu l'apartat 3.4.6). Es troba situat al primer intró del gen *ACE2*. Ha estat genotipat dins el projecte *HapMap* (consulteu l'apartat 3.4.6) i es troba formant un haplotip amb 12 SNPs més d'aquest gen (rs2316903, rs2023802, rs1514279, rs4646152, rs4646153, rs2158083, rs757066, rs971249, rs4646153, rs2048684, rs4646156 i rs2048683). La distribució al·lèlica descrita pel *HapMap* en població de raça blanca –d'origen italià de la Toscana– és de 35% d'al·lel minoritari A i 65% d'al·lel majoritari G.

**rs2285666 (c.439+4C>T)**

Aquest polimorfisme es troba al cromosoma X (Xp22.2), a la posició 13392031 (*reference assembly*). Es troba situat a la quarta base de l'intró 3 del gen *ACE2*, a la zona d'unió exó-intró. La distribució al·lèlica descrita per l'*NCBI* (consulteu l'apartat 3.4.5) en població caucàsica és del 30% d'al·lel minoritari T i 70% d'al·lel majoritari C. No està genotipat pel projecte *HapMap*.

Merwe *et al.* no han trobat cap relació entre aquest polimorfisme i la hipertròfia cardíaca (69), mentre que Frojdo *et al.* (68) tampoc no l'han pogut associar amb nefropatia diabètica.

**rs879922 (c.1542-361C>G)**

Aquest polimorfisme es troba al cromosoma X (Xp22.2), a la posició: 13372490 (*reference assembly*). Es troba situat a l'onzè intró del gen *ACE2*. La distribució al·lèlica descrita per *HapMap* és de 67% d'al·lel majoritari C i 33% d'al·lel minoritari G. Es troba formant un haplotip amb 5 SNPs més (rs1514280, rs4646174, rs4240157, rs1514280 i rs233575).

L'al·lel minoritari (G) està relacionat amb un engruiximent de la paret septal i hipertròfia ventricular esquerra, especialment en homes (57). Merwe *et al.* relacionen aquest mateix al·lel amb hipertròfia cardíaca (69). Pel que fa a nefropatia diabètica, Frojdo *et al.* (68) no han trobat cap associació amb aquest polimorfisme.

**1.5.3 Gen de l'angiotensinogen**

El gen que codifica per l'angiotensinogen (*AGT*) es troba al cromosoma 1 (1q42-q43) a la mateixa regió que el gen que codifica per la renina, i conté 5 exons.

L'angiotensinogen és una proteïna de 485 aminoàcids sintetitzada fonamentalment a les cèl·lules hepàtiques. Es troba a la fracció de l' $\alpha$ -globulina plasmàtica. La davallada de la pressió sanguínia estimula la secreció de renina a la circulació plasmàtica per part del ronyó. La renina escindeix el decapeptid terminal de l'angiotensinogen, denominat angiotensina I, el qual en darrer terme es transforma en angiotensina II, la molècula efectora.

Estudiant la relació entre l'angiotensinogen i la hipertensió arterial, Jeunemaitre *et al.* (70) van descriure el polimorfisme p.M235T que implica un canvi d'una metionina per una treonina a la posició 235 de la proteïna. És degut a un canvi de timina a citosina a l'exó 2, concretament a la posició 9543 del gen, que correspon a la posició 803 del cDNA (c.803T>C, rs699). Posteriorment s'ha sabut que el canvi d'aminoàcid

mencionat es produeix a la posició 268 de la proteïna i per això, la denominació correcta és p.M268T. Tot i això, a la literatura científica, aquest polimorfisme es continua citant exclusivament per la seva denominació original, i així ho seguirem fent nosaltres en aquesta tesi.

L'equip de Jeunemaitre va concloure que la variant T del polimorfisme p.M235T estava relacionat amb una major predisposició a patir la malaltia. Van dur a terme un estudi d'expressió gènica, en el qual van relacionar l'al·lel T amb una concentració plasmàtica d'angiotensinogen més elevada després de tractament amb etinilestradiol i una estimulació aguda amb furosemda i captopril. Els pacients amb genotip TT van presentar un increment més pronunciat de la concentració d'angiotensinogen en el plasma respecte els MM. Tot i això, la normalització del sistema renina-angiotensina es va produir en un espai de temps molt curt, a través d'un descens de l'alliberament de renina, que va anul·lar l'efecte de l'excés d'angiotensinogen (71).

Es va pensar que aquesta variant podria tenir algun paper en la susceptibilitat i progressió de la nefropatia diabètica, donat que està relacionada amb la hipertensió, però l'únic estudi d'expressió en nefropatia que s'ha publicat al respecte presenta conclusions oposades: Osawa *et al.* (72) va estudiar l'expressió renal de mRNA en pacients sans i va observar que els individus MM tenien una expressió d'angiotensinogen més elevada que els TT. Va concloure que, al contrari del que s'havia acceptat fins al moment, era l'al·lel M el que podria conferir susceptibilitat a la nefropatia diabètica.

Quan a la progressió de la malaltia, s'ha publicat que l'al·lel M afavoreix la progressió de la mateixa, ja sigui sol o en combinació amb altres polimorfismes més del RAS (73), mentre que d'altres autors neguen l'associació d'aquest polimorfisme a cap patologia renal derivada de la diabetis (74-75).

Tampoc no existeixen estudis concloents respecte la relació entre la mortalitat en diàlisi i el polimorfisme p.M235T de l'AGT (76).

#### **1.5.4 Gen del receptor d'angiotensina II de tipus 1**

El gen que codifica pel receptor d'angiotensina II de tipus 1 (*AGTR1*) es troba al cromosoma 3 (3q21-q25).

L'angiotensina II interactua al cor i als ronyons mitjançant la unió a proteïna G de membrana cel·lular, la qual es troba acoblada a dos tipus diferents de receptors, el de tipus 1 i el de tipus 2. Els receptors de tipus 1 sembla que faciliten la major part dels efectes cardiovasculars de l'angiotensina II, és a dir, vasoconstricció i hipertròfia cardíaca i vascular. Hi ha fins a quatre subtipus de receptors de tipus 1: 1A, 1B, 1C,

1D, que són producte de l'*splicing* alternatiu dels transcrits d'RNAm (77). El paper dels receptors de tipus 2 és menys clar, encara que es suggereix que podria ser important en el desenvolupament fetal, la inhibició del creixement i la diferenciació cel·lular (53). També modula l'acció del receptor d'angiotensina II de tipus 1 bloquejant molts dels seus efectes (21).

Bonnardeaux *et al.* (78) van identificar una associació entre el polimorfisme g.1166A>C (rs5186) localitzat a la zona 3' de la regió no traduïda del gen (3'UTR) de l'*AGTR1* i la hipertensió. Concretament, es va relacionar l'al·lel C del polimorfisme, amb una major prevalença d'aquesta malaltia (79).

Pel que fa a la nefropatia tampoc no hi ha hagut consens respecte a l'al·lel de mal pronòstic. L'al·lel C ocasionaria risc de desenvolupar la malaltia segons han publicat molt recentment Ahluwalia *et al.* (80). Altres autors han trobat resultats coherents amb l'anterior, en l'estudi de la progressió: l'al·lel C es va relacionar amb una progressió més curta de la nefropatia fins a diàlisi (81). Però aquests resultats contrasten enormement amb altres estudis que emeten conclusions oposades: en pacients diabètics, l'al·lel A va semblar que predisposava a una progressió més ràpida de la nefropatia juntament amb altres polimorfismes de gens del RAS (73).

No existeixen estudis concloents respecte la relació entre la mortalitat en diàlisi i el polimorfisme g.1166A>C de l'*AGTR1* (76).



## **2. HIPÒTESI I OBJECTIUS**





## HIPÒTESI

Tenint en compte el que s'ha exposat fins ara, es planteja la següent hipòtesi: a més a més dels factors de risc no genètics, alguns polimorfismes dels gens del sistema renina-angiotensina poden influir en la instauració i progressió de la nefropatia en pacients diabètics de tipus 2, així com també en la mortalitat una vegada iniciat el tractament amb diàlisi. Addicionalment, l'efecte dels polimorfismes podria ser poligènic, fruit de la interacció entre ells.

Per a això s'han plantejat els següents objectius:

### Objectius principals

- Estudiar la influència dels polimorfismes I/D (*ACE1*), p.M235T (*AGT*), g.1166A>C (*AGTR1*), c.186+2053G>A, c.439+4C>T i c.1542-361C>G (*ACE2*) de gens del sistema renina-angiotensina sobre la supervivència de pacients diabètics de tipus 2 en tractament amb diàlisi.
- Estudiar la influència dels polimorfismes esmentats sobre la progressió de la nefropatia, una vegada ja establerta, en pacients diabètics de tipus 2.
- En ambdós casos observar l'efecte individual que té cada un dels polimorfismes estudiats i també l'efecte conjunt resultant d'agrupar-los.

### Objectiu secundari

- Realitzar un estudi preliminar retrospectiu de la susceptibilitat dels pacients diabètics de tipus 2 a desenvolupar nefropatia en funció d'aquests polimorfismes.



### **3. MATERIAL I MÈTODES**



## 3.1 PACIENTS I RECOLLIDA DE DADES

### 3.1.1 Mortalitat en diàlisi

Les mostres recollides per a la realització de l'estudi de supervivència, procedien de pacients diabètics de tipus 2 amb nefropatia i en tractament renal substitutiu, ja fos hemodiàlisi o diàlisi peritoneal. Es van seleccionar 100 pacients atesos al Servei de Nefrologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge que van entrar al programa de diàlisi entre els anys 1993 i 2008.

Els pacients que van morir durant els primers 3 mesos després de l'inici de diàlisi van ser exclosos de l'estudi perquè probablement altres factors clínics previs a la instauració del tractament van contribuir al desenllaç. Es van descartar també els pacients als quals es va iniciar el tractament substitutiu en un temps inferior als tres mesos des de la primera visita al servei de Nefrologia, per evitar incloure derivacions d'un altre centre de diàlisi.

S'han recollit les següents dades de cada pacient:

#### - Dades prèvies a la diàlisi:

- Srm—Creatinini; c.subst. i estimació de la velocitat de filtració glomerular a la primera visita al Servei de Nefrologia que dóna idea de si la remissió a l'especialista es massa tardana.
- Comorbiditat cardiovascular prèvia a la diàlisi (no = 0, sí = 1)
- Sexe (home = 0, dona = 1)
- Història d'hipertensió prèvia no controlada (no = 0, sí = 1, segons el valor discriminant 140/90 mmHg (82, 83)).

#### - Dades en el moment de la instauració de la diàlisi:

- Data de l'inici de diàlisi
- Edat
- Srm—Creatinini; c.subst. i estimació de la velocitat de filtració glomerular residual que presenta el pacient just abans d'iniciar la diàlisi.
- Tipus de diàlisi (hemodiàlisi = 0, peritoneal = 1)
- San—Leucòcits; c.núm, com a marcador de septicèmia.
- San—Hemoglobina; c.massa i Srm—Albúmina; c.massa com a marcadors de l'estat nutricional del pacient
- Srm—Colesterol; c.subst, com a marcador de dislipèmia
- Hb(San)—Hemoglobina A1c; fr.subst, com a marcador del control de la concentració de glucosa en plasma.

**- Dates del final del seguiment dels pacients:**

- Data de la mort del pacient, en el cas que s'hagi produït
- Data de pèrdua de seguiment del pacient, ja sigui per transferència a un altre centre de diàlisi o per trasplantament renal.
- La pròpia data de finalització de l'estudi (16/10/2008) pels pacients que continuaven en diàlisi quan es va decidir concloure el seguiment en l'estudi de la mortalitat.

A l'anàlisi de la supervivència, els darrers dos casos constitueixen els anomenats "censurats", és a dir, tots aquells pacients als quals no se'ls produeix l'esdeveniment d'interès (en aquest cas, la mort) al llarg del seguiment.

### **3.1.2 Progressió de la nefropatia**

S'han seleccionat de forma retrospectiva 320 pacients diabètics de tipus 2 que van ser atesos per primera vegada al Servei de Nefrologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge entre els anys 1976 i 2006. Tots els pacients inclosos van ser diagnosticats d'insuficiència renal crònica seguint els criteris establerts a l'apartat 1.2.2 i van tenir un seguiment posterior superior als 2 anys. Amb l'objectiu d'homogeneitzar la població d'estudi, es van excloure tant els pacients monorenals com els que a la primera visita a l'especialista presentaven una velocitat de filtració glomerular inferior a 30 mL/min/1,73m<sup>2</sup>. Es van excloure els pacients amb estadis 4 i 5, perquè l'objectiu del present apartat és valorar la progressió de la nefropatia, i en aquests pacients, la malaltia ja està o molt o completament evolucionada a insuficiència renal crònica terminal, fet que dificulta el càlcul de la progressió.

S'han recollit les següents dades de cada pacient:

- **A la primera visita al servei de nefrologia (basal):**
  - Srm—Creatinini; c.subst. i estimació de la velocitat de filtració glomerular (MDRD-IDMS; consulteu l'apartat 1.2.5.1.1)
  - Pac(Uri)—Excreció de proteïna; cabal massa(24h)
  - Edat
  - Sexe (home = 0, dona = 1)
  - Índex de massa corporal (IMC)
  - Tensió arterial sistòlica i diastòlica
  - Srm—Albúmina; c.massa i San—Eritròcits; fr.vol.(hematòcrit), com a marcadors de l'estat nutricional

- Hb(San)—Hemoglobina A1c; fr.subst. com a marcador del control de la concentració de glucosa en plasma
- Srm—Colesterol; c.subst. i Srm—Triglicèrid; c.subst. com a marcadors de dislipèmia
- **Durant el seguiment** (s'ha recollit la resposta sí/no com a única dada representativa de tot el període de seguiment)
  - Tabaquisme durant el seguiment al Servei de Nefrologia (no fumador = 0, fumador i ex-fumador = 1)
  - Tractament farmacològic amb IECA i/o ARAll (tractament farmacològic amb un o ambdós fàrmacs durant períodes inferiors a 6 mesos = 0, tractaments més prolongats = 1)
- **Durant el seguiment** (mesures anuals de cada visita a l'especialista):
  - Tensió arterial sistòlica i diastòlica
  - Hb(San)—Hemoglobina A1c; fr.subst.
  - Srm—Colesterol; c.subst.
  - Pac(Uri)—Excreció de proteïna; cabal massa(24h)
  - Estimació de la velocitat de filtració glomerular

### **Criteris d'avaluació de la progressió de les variables de control**

Per cada pacient s'ha recollit una sèrie de resultats anuals de les cinc variables de control incloses en el seguiment dels pacients (això exclou la velocitat de filtració glomerular, perquè és la variable dependent i la seva avaluació mereix un capítol a part): Hb(San)—Hemoglobina A1c; fr.subst., Srm—Colesterol; c.subst., Pac(Uri)—Excreció de proteïna; cabal massa(24h), tensió arterial sistòlica i tensió arterial diastòlica.

Per tal de poder-les introduir als models de les regressions s'ha calculat la *mitjana anual* i l'*àrea sota la corba anual* (AUC, integral de la corba que conformen tots els punts dividit entre els anys de seguiment).

S'han fet models de regressió univariants amb el resultat basal, la mitjana i l'àrea sota la corba anual de cada una d'aquestes magnituds per escollir quin criteri guarda més relació amb la progressió de la nefropatia, en base a la significació estadística aconseguida.

### 3.1.3 Susceptibilitat a la nefropatia

S'ha realitzat un estudi preliminar retrospectiu de casos i controls on s'han inclòs 69 pacients diabètics de tipus 2 sense cap signe de nefropatia (controls) i 227 amb nefropatia establerta (casos). Els dos grups s'han igualat en edat i sexe.

#### **Definició de pacient diabètic de tipus 2**

Per tal que un pacient fos classificat com a diabètic de tipus 2 havia de complir les següents característiques: que fos major de 30 anys en el moment del diagnòstic, que no tingués cap història de cetoacidosi diabètica i que no requerís insulina durant els 6 mesos posteriors al diagnòstic (82).

#### **Definició de pacient diabètic de tipus 2 sense nefropatia**

S'han inclòs només aquells pacients que sempre han tingut una velocitat de filtració glomerular superior a 60 mL/min/m<sup>2</sup> i han presentat proteïnúria com a màxim una única vegada i mai a la darrera analítica disponible. Tots els pacients inclosos tenien un seguiment clínic de com a mínim cinc anys.

#### **Definició de pacient diabètic de tipus 2 amb nefropatia**

S'han inclòs aquells pacients diabètics de tipus 2 que compleixen els criteris de diagnòstic d'insuficiència renal crònica (vegeu apartat 1.2.1).

#### **En el moment de la inclusió a l'estudi es van recollir les següents dades:**

- Sexe (dona = 1, home = 0)
- Edat
- tensió arterial sistòlica i diastòlica
- Tabaquisme (no = 0, sí = 1)
- Índex de massa corporal
- S<sub>rm</sub>—Albúmina; c.massa
- S<sub>an</sub>—Eritròcits; fr.vol. (hematòcrit)
- Hb(S<sub>an</sub>)—Hemoglobina A1c; fr.subst.
- S<sub>rm</sub>—Colesterol; c.subst.

Per finalitzar el capítol que fa referència a la selecció dels pacients, volem fer constar que tots ells van donar el seu consentiment informat a participar en els estudis. Degut a que la recollida de dades ha estat principalment retrospectiva, es va haver de descartar la inclusió d'alguns pacients per tenir històries clíniques molt incompletes tot i complir els requisits d'inclusió.



## 3.2 CRITERIS D'AVUACIÓ DE LA PROGRESSIÓ DE LA NEFROPATIA

Segons una guia internacional emesa per la NKF-KDOQI (83), la progressió de malaltia renal es defineix com:

1. un fracàs renal, definit com l'inici de la teràpia renal substitutiva, o bé
2. una disminució de la funció renal, estimada mesurant la VFG, la depuració de creatinini o la concentració en sèrum de creatinini en un pacient que ha estat sotmès a un seguiment longitudinal fiable amb mesures comparables entre sí de la funció renal. Pel cas de la nefropatia diabètica, s'afegeix a la definició el desenvolupament i empitjorament de la proteïnúria.

Diversos estudis han demostrat que la taxa de disminució de l'invers de la concentració de creatinini en el sèrum és constant en el temps (84, 85). Com que la relació entre el creatinini i la VFG és precisament inversa, s'ha assumit que la disminució constant de  $1/S_{\text{rm}} - \text{Creatinini}$  reflecteix una disminució constant de la VFG. Aquesta disminució que és relativament constant en un mateix pacient, és molt diversa entre individus. Pel cas concret de la nefropatia diabètica, les mitjanes de la taxa de disminució de la VFG reportades en articles internacionals és molt variada: pren valors entre 0 i 12,6 mL/min per any (83).

Històricament, s'han utilitzat criteris molt diversos per avaluar la progressió de la nefropatia com per exemple el temps fins a doblar la concentració de creatinini en el plasma (73-75), el temps des del diagnòstic de malaltia renal o des que la concentració plasmàtica de creatinini supera una certa xifra fins arribar a insuficiència renal crònica terminal (21), o bé el pendent de l'invers de la concentració de creatinini en el plasma (83) entre d'altres.

Ja que els organismes internacionals recomanen que la nefropatia es graduï segons la VFG (consulteu l'apartat 1.2.5.1), creiem que els criteris per a l'avaluació de la seva progressió s'haurien de basar en les variacions de la velocitat de filtració glomerular, ja sigui mesurada directa o indirectament mitjançant l'MDRD. A continuació exposem els criteris que s'han elaborat a la present tesi. D'una banda, hem incorporat quatre criteris que empren la VFG per al càlcul: pendent i disminució relativa de la VFG, temps fins a passar al següent estadi d'insuficiència renal crònica, i temps fins a disminuir a la meitat la VFG. Per altra banda, s'han incorporat addicionalment els mateixos càlculs però substituint la VFG per la concentració de creatinini en sèrum, ja que moltes publicacions així ho calculen. Evidentment el criteri canvi d'estadi d'insuficiència renal no té cap paral·lelisme en el creatinini, ja que els estadis es defineixen amb la VFG.

**1. Pendent de la disminució de la velocitat de filtració glomerular:**

$$pendent = \frac{MDRD_F - MDRD_B}{anys\ de\ seguiment}$$

on  $MDRD_F$  és la velocitat de filtració glomerular final –en el darrer any del seguiment– i  $MDRD_B$  és la velocitat de filtració glomerular basal –a la primera visita–.

**2. Pendent de l'augment de la concentració de creatinini en el plasma.**

Es segueix un càlcul similar al del pendent de l'MDRD.

**3. Disminució relativa anual de la velocitat de filtració glomerular.**

És el percentatge mitjà anual de disminució de la filtració glomerular per a cada pacient i representatiu de tot el seguiment. És necessari que aquest valor estigui corregit tant pels anys de seguiment com per la filtració glomerular basal de cada individu, ja que són característiques heterogènies dels pacients de l'estudi.

La diferència relativa (dif relat) anual en percentatge és la següent (podeu consultar l'annex A per entendre el desenvolupament de la fórmula):

$$dif\ relat\ anual = \left[ \left( \frac{MDRD_F}{MDRD_B} \right)^{\frac{1}{anys\ seguiment}} - 1 \right] \times 100$$

La disminució relativa s'expressa en unitats de percentatge i és una variable lineal.

**4. Augment relatiu anual de la concentració de creatinini en el plasma.**

Es segueix un càlcul similar al de la velocitat de filtració glomerular.

**5. Temps que triga cada individu a progressar fins al següent estadi d'insuficiència renal crònica.**

S'han seleccionat els pacients que iniciaven un estadi d'insuficiència renal a la primera visita al nefròleg (VFG del límit superior de l'estadi  $\pm$  10mL/min) i s'ha comptat el temps que trigaven a iniciar el següent estadi. Així doncs, s'han inclòs els pacients que es trobaven amb una VFG entre 80 i 100 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (al voltant de l'inici de l'estadi 2), entre 70 i 50 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (al voltant de l'inici de l'estadi 3) i entre 40 i 30 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (just abans de l'inici de l'estadi 4) i s'ha mesurat el temps que trigaven a tenir una VFG inferior a 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (estadi 3), 30 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (estadi 4) i 15 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (estadi 5), respectivament.

L'inconvenient d'aquest criteri és que només es poden incloure 212 pacients del total, perquè la resta van arribar amb VFG intermèdies.

**6. temps que triga cada individu a disminuir a la meitat la velocitat de filtració glomerular basal.**

**7. temps que triga cada individu a doblar la concentració de creatinini basal en el plasma.**

La metodologia estadística necessària per valorar l'efecte genètic sobre els criteris 1-4 de progressió de la nefropatia és la regressió lineal, mentre que pels criteris 5-7 és la regressió de Cox.

El seguiment dels pacients que acaben requerint diàlisi conclou a l'inici del tractament renal substitutiu, ja que si no, els pendents i les disminucions relatives de la velocitat de filtració glomerular serien equívocament més suaus.

Donat que tots aquests criteris són formes equivalents de mesurar la progressió de la nefropatia, per evitar un excés d'informació redundat, a l'apartat de resultats només es mostraran les troballes relacionades amb els criteris que es basen en l'MDRD, perquè considerem que aquest criteri és el que dona una estimació més bona de la velocitat de filtració glomerular del ronyó. Això redueix a 4 els criteris dels quals desenvoluparem els resultats a la secció corresponent (1, 3, 5 i 6). Les regressions obtingudes pels criteris que empren la concentració plasmàtica de creatinini (2, 4 i 7) es poden consultar a l'annex.

### 3.3 CRITERI D'AVALUACIÓ DE L'EFECTE CONJUNT DELS POLIMORFISMES

L'avaluació conjunta dels polimorfismes genètics ha constituït un dels objectius principals d'aquest treball. Una de les hipòtesis que ens hem plantejat és que efectes que poden passar desapercebuts en l'estudi individual d'un polimorfisme genètic puguin ser importants quan es valoren conjuntament amb altres polimorfismes; és a dir, que hi hagi sinèrgia entre els polimorfismes. Per aquest motiu, l'estudi estadístic no s'ha realitzat només de forma independent per cada polimorfisme, sinó que s'ha volgut valorar l'efecte conjunt de tots ells.

S'ha seguit el criteri publicat per Jacobsen *et al.* (73) que consisteix en crear una nova variable, anomenada en el nostre treball "*nombre d'al·lels de risc*" que s'obté sumant el nombre d'al·lels considerats de risc dels diversos polimorfismes. En el cas dels polimorfismes que es troben al cromosoma X, els homes s'han considerat homozigots per una o l'altra variant i s'han comptabilitzat com si tinguessin 2 al·lels.

Hem procedit de la següent manera:

- 1) En primer lloc, s'ha realitzat l'estudi individual de cada polimorfisme genètic. Si el coeficient de regressió que valora l'efecte genètic s'ha estimat amb una  $p$  inferior a 0,2, s'ha seleccionat l'**al·lel de risc** d'aquest polimorfisme. Hem interpretat que tot i que l'efecte no és estadísticament significatiu, sí que ho podria ser si s'addiciona a l'efecte d'un altre polimorfisme de la via del RAS. Quan la  $p$  és superior a 0,2, el polimorfisme es descarta per l'estudi combinat.
- 2) En segon lloc, s'ha fet la **suma dels al·lels de risc** que porta cada individu. La nova variable "*nombre d'al·lels de risc*" pot prendre valors de 0 a 4 al·lels (quan s'analitzen combinacions de 2 polimorfismes) fins a valors de 0 a 12 al·lels (a la combinació dels 6 polimorfismes).
- 3) En tercer lloc, s'han executat els models de regressions múltiples amb les mateixes variables de control habituals afegint també la variable "*nombre d'al·lels de risc*" per a totes les possibles combinacions de polimorfismes: un mínim d'una combinació de 2 polimorfismes (quan únicament dos dels sis polimorfismes s'han seleccionat en el punt 1), i un màxim de 15 combinacions de 2 polimorfismes + 20 combinacions de 3 polimorfismes + 15 combinacions de 4 polimorfismes + 6 combinacions de 5 polimorfismes + 1 combinació amb els 6 polimorfismes (en el cas que tots 6 polimorfismes hagin estat seleccionats en el punt 1).

- 4) Per **escollir quina és la millor combinació** s'han seguit els següents criteris, per ordre:
- a. S'ha escollit la combinació estadísticament més significativa per a cada grup de 2, 3, 4, 5 i 6 polimorfismes.
  - b. S'ha estimat l'efecte màxim que s'explica pel genotip per a cada combinació escollida de 2, 3, 4, 5 i 6 polimorfismes. Si és una regressió lineal múltiple, l'efecte màxim es calcula multiplicant el coeficient de regressió pel nombre màxim d'al·lels de risc de la combinació. Si es tracta d'una regressió de Cox es calcula elevat el coeficient de regressió al nombre màxim d'al·lels de risc. Així es troba l'efecte de tenir tots els al·lels de risc respecte no tenir-ne cap. S'ha escollit la combinació que més efecte genètic explica. A igualtat d'efecte, s'ha escollit la combinació que inclou menys polimorfismes.

### 3.4 MÈTODES

#### 3.4.1 Esquema general

A la *figura 2* es pot veure el procediment general seguit per analitzar les mostres que van arribar a l'Àrea de Bioquímica i Biologia Molecular del Laboratori Clínic de l'Hospital Universitari de Bellvitge.

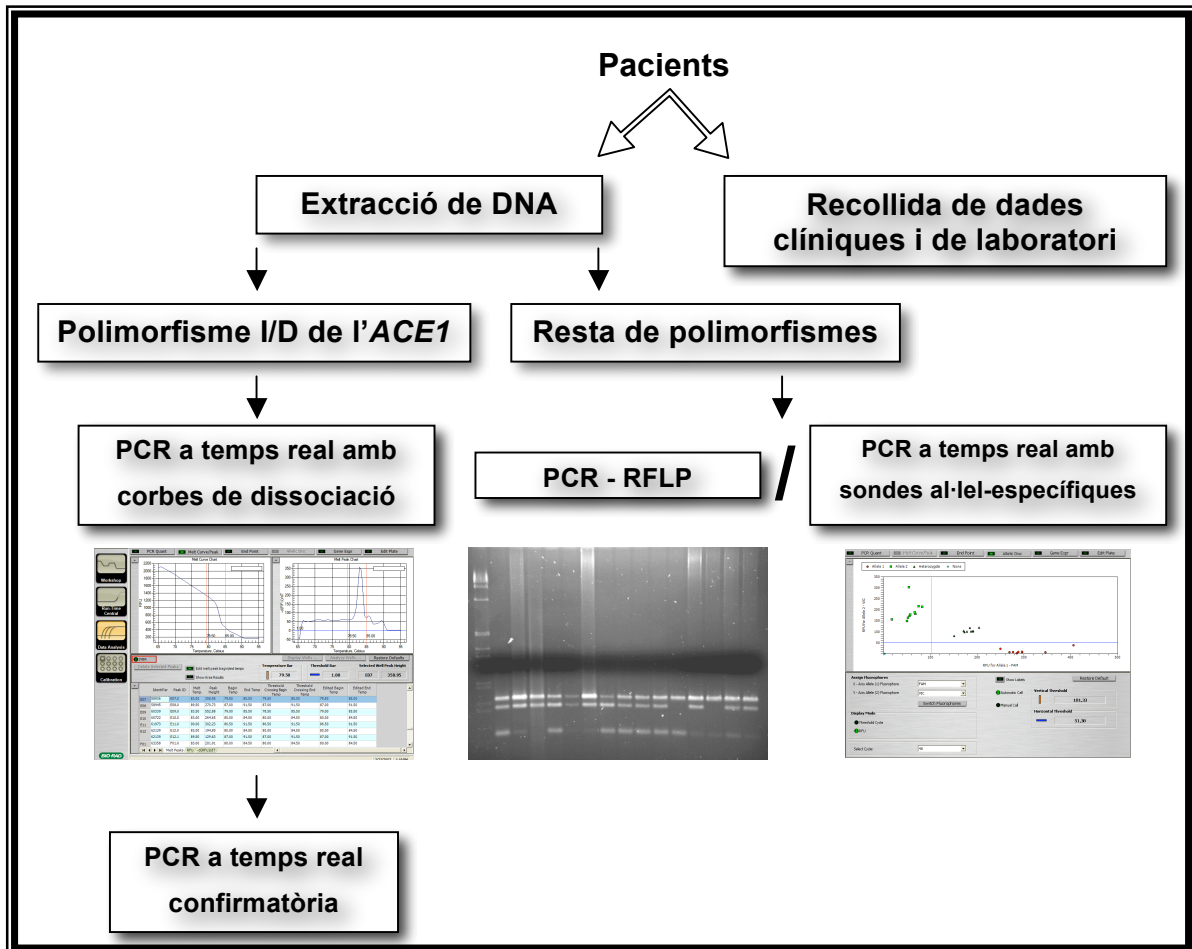


Figura 2. Esquema dels mètodes emprats

#### 3.4.2 Extracció de DNA

El DNA s'extreu dels leucòcits presents en sang perifèrica. Es treballa a partir de sang anticoagulada (200 µL) recollida en tubs de 3 mL amb EDTA-K3. Si la mostra no es processa immediatament després de la recepció, es guarda en nevera a 4°C fins al moment de l'extracció del DNA.

Es segueix el procediment descrit al *High Pure PCR Template Preparation Kit* subministrat per Roche:

- Les cèl·lules de la sang són lisades mitjançant incubació amb guanidina-HCl 6M, urea 10 mM, Tris HCl 10 mM, 20% Triton X-100 (v/v) a pH de 4.4 i proteïnasa K, que permet també la inactivació de la DNAsa endògena.
- Els àcids nucleics s'uneixen a la fibra de vidre continguda als tubs subministrats per l'equip, mitjançant isopropanol.
- Posteriorment s'efectua un rentat amb guanidina-HCl 5M, Tris HCl 20 mM, a pH de 6,6 en etanol, per tal d'eliminar els contaminants inhibidors de la PCR.
- Es duen a terme més rentats amb NaCl 20mM, Tris HCl 2 mM, a pH de 7,5 en etanol per purificar l'àcid nucleic de sals, proteïnes i altres impureses cel·lulars.
- L'àcid nucleic s'elueix de la fibra de vidre mitjançant Tris HCl 10 mM, a pH de 8,5.

Les mostres de DNA són estables durant més d'un any congelades a -20°C.

### 3.4.3 PCR

El polimorfisme I/D de l'*ACE1* s'ha genotipat mitjançant PCR a temps real amb corbes de dissociació.

El polimorfisme c.1542-361C>G de l'*ACE2* s'ha genotipat mitjançant PCR a temps real amb sondes al·lel-específiques.

Pel que fa a la resta de polimorfismes, en un inici van ser analitzats mitjançant PCR-RFLP, però posteriorment es va canviar la metodologia a PCR a temps real amb sondes al·lel-específiques perquè s'escurça molt el temps d'anàlisi. Per tal de comprovar la intercanviabilitat, es van processar 20 mostres de cada polimorfisme per ambdós mètodes. A més a més, a cada reacció de PCR s'adjuntaven entre una i tres mostres que ja havíem genotipat amb anterioritat com a control del procediment.

Descrivim a continuació tots tres mètodes.

#### 3.4.3.1 PCR-RFLP

L'estudi dels polimorfismes g.1166A>C del gen *AGTR1*, p.M235T del gen *AGT*, c.186+2053G>A i c.439+4C>T del gen *ACE2* s'ha realitzat, en un inici, mitjançant reaccions en cadena de la polimerasa (PCR) seguit de l'anàlisi dels fragments de restricció de longitud polimòrfica (RFLP) (76, 86).

Barreja de reacció de la PCR a les concentracions finals indicades, en un volum de 25µL:

- **Trifosfodesoxiribonucleòtids** (dNTP) 100 µmol/L de cada un
- **Encebadors** específics 1 µmol/L de cada un
- **Polimerases:** *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) 0,02 U/µL  
o bé *Taq DNA Polymerase* (Roche) 0,03 U/µL
- **Tampó 10x** que conté MgCl<sub>2</sub>, KCl i Tris-HCl
- Mostra de **DNA** entre 50 i 200 ng (2-8 ng/µL)

Les polimerases es comercialitzen amb el seu tampó corresponent (Roche) que conté la barreja de MgCl<sub>2</sub>, KCl i Tris-HCl preparat com a solució 10x (*Expand High Fidelity PCR Buffer (10x) with MgCl<sub>2</sub>* (ref.11759167001) i *PCR reaction buffer, 10x conc.* (ref.11271318001) si es treballa amb *Taq DNA Polymerase*).

Programa bàsic de la PCR (iCycler, Bio-Rad):

Etapa inicial: <b>2 min a 95°C</b>	
<b>nº de cicles x</b>	desnaturalització: <b>45s a 94°C</b>
	hibridació dels encebadors: <b>1 min a T<sub>h</sub></b>
	extensió de la cadena: <b>1 min a 72°C</b>
Etapa final: <b>1 min a 72°C</b>	
La T <sub>h</sub> és la temperatura d'hibridació dels encebadors al motlle de DNA.	

	<b>g.1166A&gt;C</b>	<b>p.M235T</b>	<b>c.186+2053G&gt;A</b>	<b>c.439+4C&gt;T</b>
<b>Polimerases</b> (Roche)	Expand	Taq	Taq	Expand
<b>Nº de cicles</b>	30	30	35	35
<b>T<sub>h</sub> (°C)</b>	63	68	60	60
<b>Mida del fragment (pb)</b>	1618	165	193	367

**Taula 1.** Condicions metodològiques de la PCR de cada polimorfisme estudiat. La mida del fragment s'expressa en parells de bases (pb). T<sub>h</sub> és la temperatura d'hibridació

A la *taula 1* es poden consultar les condicions metodològiques de la PCR pròpies de cada polimorfisme i la mida del fragment de DNA que s'obté després de l'amplificació. Les seqüències dels encebadors (Isogen Life Science) es poden trobar a la *taula 2*. L'encebador *reverse* de l'AGT conté un desaparellament de nucleòtids que provoca l'aparició d'una diana per l'enzim de restricció Asp I (*mismatch*).



Polimorfismes	Seqüència dels encebadors
g.1166A>C de l'AGTR1	f: 5'-AAA TGC TTG TAG CCA AAG TCA CCT-3' r: 5'-TTC ATA CTC ATT CAA GGT AGT CT-3'
p.M235T de l'AGT	f: 5'-CCG TTT GTG CAG GGC CTG GCT CTC T-3' r: 5'-CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA <u>CCC</u> C-3'
c.186+2053G>A de l'ACE2	f: 5'-TCA CAC CTA CAG GGG AAG AAA-3' r: 5'-CAG GCC ATA GGT CTG GTT GT-3'
c.439+4C>T de l'ACE2	f: 5'-GCT AGT CGA CAG TGG GGA AA-3' r: 5'-TGT TGA AAC ACA CAT ATC TGC AA-3'

**Taula 2.** Seqüències 5' – 3' dels encebadors emprats amb el mètode PCR-RFLP. F és l'encebador forward, i r el reverse. L'encebador reverse de l'AGT conté dues bases no complementàries amb la seqüència del gen (bases subratllades).

Polimorfismes	Enzim de restricció	Productes de la digestió (pb)
g.1166A>C de l'AGTR1	<b>Dde I</b> (Roche)	<b>Al·lel A:</b> 602, <b>560</b> , 251, 205 <b>Al·lel C:</b> 602, <b>417</b> , 251, 205, <b>143</b>
p.M235T de l'AGT	<b>Asp I</b> (Roche)	<b>Al·lel M:</b> 165 <b>Al·lel T:</b> 144
c.186+2053G>A de l'ACE2	<b>Alu I</b> (BioLabs)	<b>Al·lel G:</b> 100, 93 <b>Al·lel A:</b> 193
c.439+4C>T de l'ACE2	<b>Rsa I</b> (Roche)	<b>Al·lel T:</b> 287, 80 <b>Al·lel C:</b> 367

**Taula 3.** Enzims de restricció i productes de la digestió per cada polimorfisme.

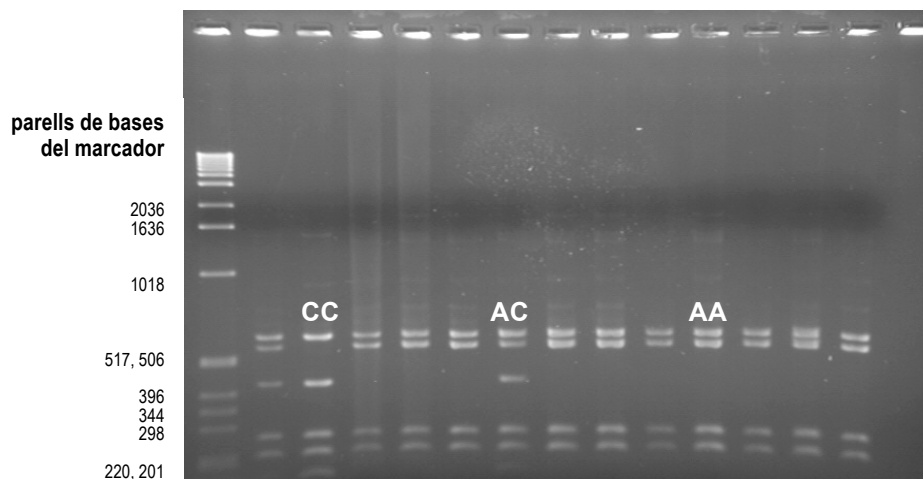
Posteriorment els fragments de DNA obtinguts es van digerir amb 4U de l'enzim de restricció corresponent excepte pel producte de la PCR del polimorfisme p.M235T que es va digerir amb 3U de l'enzim Asp I. Les barreges de digestió (producte de PCR, enzim de restricció i tampó corresponent) es van deixar durant 12 hores a 37°C. La *taula 3* conté un resum dels enzims de restricció i els fragments de DNA resultants de la digestió.

Per tal de visualitzar-los, es van separar els productes mitjançant electroforesi en gel d'agarosa estàndard mitjana EEO (Ecogen, ref. AG-0220) o en agarosa MetaPhor® (Lonza ref.50180) en tampó tris-borat-EDTA 0,5x, segons si es va necessitar menys o més resolució per tal de detectar fragments més petits de DNA. L'electroforesi permet la separació de les molècules de DNA segons la mobilitat d'aquestes en un camp elèctric a través d'una matriu porosa. Tenen afinitat per l'ànode, degut a la càrrega negativa present a l'esquelet de sucre-fosfat de la cadena de DNA. La velocitat de migració dels fragments de DNA és inversament proporcional a la seva mida, de tal

forma que els fragments petits es mouran més ràpidament. La incorporació al gel d'un marcador de mida coneguda de DNA (1 Kb DNA ladder, Invitrogen ref.10488-072), permet determinar la quantitat de parells de bases que contenen els fragments de la digestió comparant la migració d'aquests amb la del marcador.

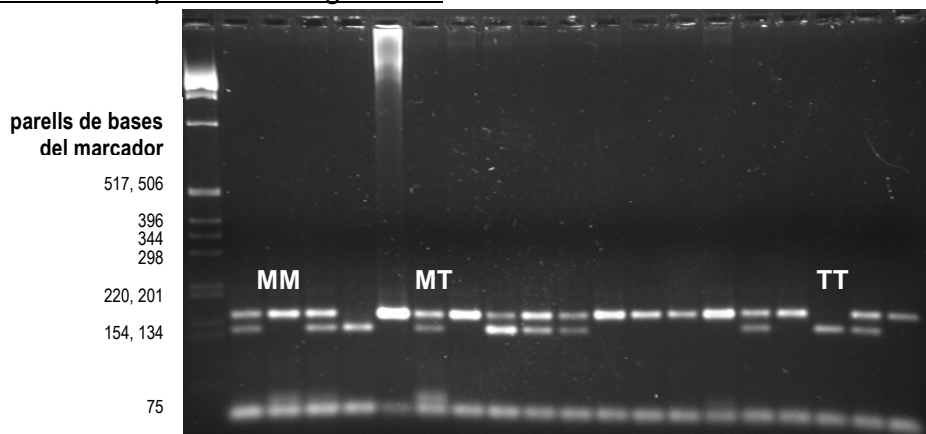
Es van tenyir els gels amb bromur d'etidi, agent intercalant de l'àcid nucleic de doble cadena que actua com a colorant. Quan s'excita amb llum ultraviolada a 302 nm, aquest reactiu emet llum fluorescent al voltant dels 600 nm i mitjançant un transil·luminador (BioDoc Analyze, Biometra®) es poden visualitzar les bandes de DNA del gel i poden ser fotografiades per la posterior interpretació (*imatges 1-5*).

#### Polimorfisme g.1166A>C del gen AGTR1

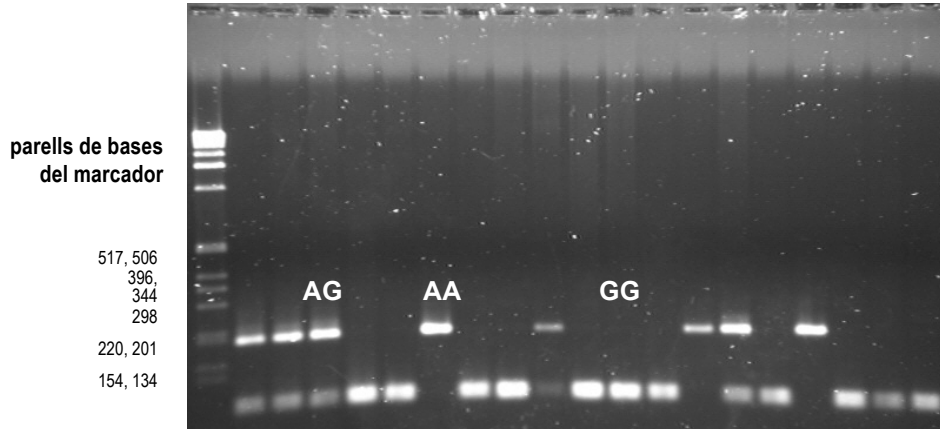


**Imatge 1.** Gel d'agarosa estàndard al 1,5%. Productes de la digestió mitjançant Dde I del fragment amplificat del gen **AGTR1**.

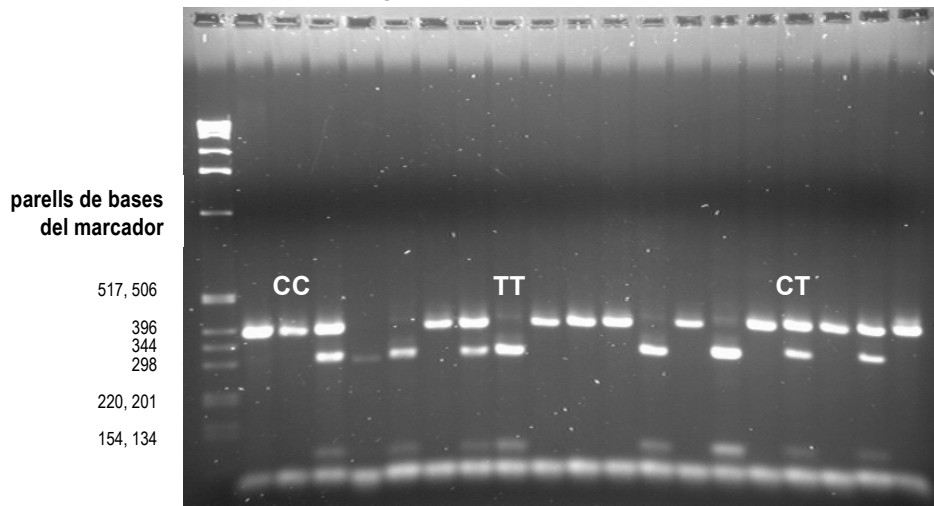
#### Polimorfisme p.M235T del gen AGT



**Imatge 2.** Gel d'agarosa MetaPhor® al 2%. Productes de la digestió mitjançant Asp I del fragment amplificat del gen **AGT**.

Polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2

**Imatge 3.** Gel d'agarosa MetaPhor® al 2%. Productes de la digestió mitjançant Rsa I del fragment amplificat del gen ACE2.

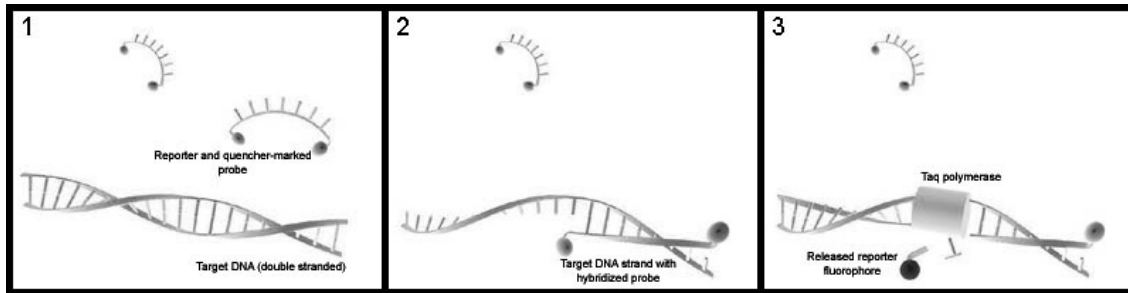
Polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2

**Imatge 4.** Gel d'agarosa estàndard al 2%. Productes de la digestió mitjançant Alu I del fragment amplificat del gen ACE2.

**3.4.3.2 PCR a temps real amb sondes al·lel-específiques**

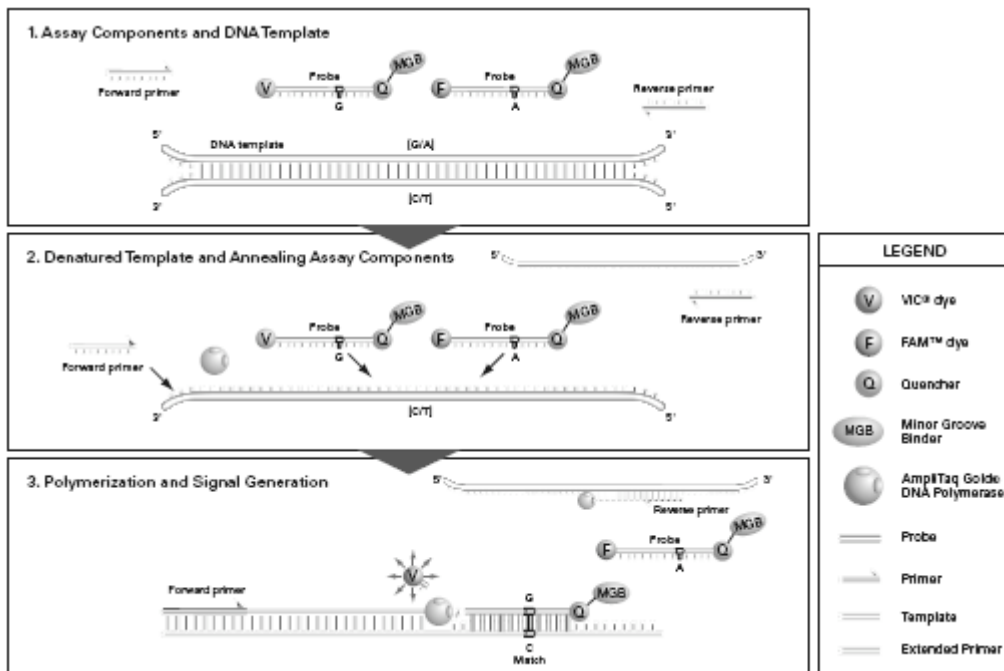
La inclusió de fluorocroms durant el procés d'amplificació del DNA permet el seguiment del procés mentre s'està duent a terme. Per aquest motiu la metodologia porta el nom de PCR a temps real. Es pot dividir en les tècniques basades en fluorocroms inespecífics com és el colorant SYBR-Green (vegeu l'apartat 3.4.3.3) i en sondes específiques com les que s'empren per la determinació d'un SNP puntual.

La tècnica amb sondes Taqman® (Applied Biosystems) consisteix en afegir dues sondes d'entre 20 i 30 pb a la barreja de la reacció, que han d'unir-se perfectament a la zona del DNA que conté l'SNP i hibriden a una zona intermèdia entre els dos encebadors.



**Imatge 5.** Esquema de la tecnologia Taqman. La figura 1 i 2 mostren com la proximitat entre fluorocrom i inhibidor impedeixen l'alliberament de fluorescència tant si les sondes es troben a la barreja de la reacció (1) com hibridades al DNA (2). En canvi, la hidròlisi de les sondes per part de la Taq polimerasa allibera el fluorocrom i permet l'emissió de fluorescència. (Imatge extreta de [appliedbiosystems.com](http://appliedbiosystems.com))

Cada una de les sondes serà complementària a una de les variants de l'SNP d'interès. Estan unides a l'extrem 5' a un fluorocrom (anomenat en anglès *reporter*) i a l'extrem 3' a una altra molècula que bloqueja l'emissió de fluorescència (anomenada en anglès *quencher*). Quan les dues molècules es troben fixades als extrems de cada sonda i el fluorocrom és excitat per llum externa, la fluorescència que emet és absorbida per l'inhibidor i la fluorescència no es pot detectar. Quan té lloc la PCR, les sondes es troben hibridades a l'amplicó però degut a la proximitat de l'inhibidor al fluorocrom no s'emet fluorescència. Quan la polimerasa que va copiant la cadena de DNA topa amb la sonda unida a la cadena, la hidrolitza mitjançant la seva capacitat 5'exonucleasa alliberant el fluorocrom de l'inhibidor. És en aquest moment quan la fluorescència pot ser detectada i mesurada (*imatge 5*); a major hibridació de la sonda a la cadena de DNA, major quantitat de fluorescència detectada.



**Imatge 6.** Esquema de la tecnologia Taqman on s'aprecia la competició de les dues sondes per la hibridació a la cadena de DNA. La sonda que finalment s'uneix és la que en darrer terme emet fluorescència. (Imatge extreta de [appliedbiosystems.com](http://appliedbiosystems.com))

Les dues sondes emprades es troben unides a fluorocroms diferents per tal que absorbeixin també a longituds d'ona diferents (per exemple FAM<sup>®</sup>, VIC<sup>®</sup>, HEX<sup>®</sup>, Cy5<sup>®</sup>) i puguin ser diferenciats (*imatge 6*). D'aquesta forma, segons la quantitat de fluorescència detectada per un i altre fluorocrom es pot classificar el pacient en homozigot per la variant 1, heterozigot o homozigot per la variant 2.

Barreja de reacció de la PCR a temps real amb sondes al·lel-específiques en un volum final de 20µL:

- **Supermix (2x)** 10 µL
- **TaqMan Validated SNP Genotyping Assay Mix (20x)** 1 µL
- Mostra d'**ADN** 5 µL
- Aigua estèril 4 µL

El tampó *iQ<sup>TM</sup> Supermix* conté la polimerasa (iTaQ DNA polymerase), dNTPs, MgCl<sub>2</sub> 6mM i estabilitzadors. El producte *TaqMan Validated SNP Genotyping Assay Mix* (Applied Biosystems) conté els encebadors i les sondes específiques per a cada SNP, marcades amb els fluorocroms FAM<sup>®</sup> i VIC<sup>®</sup> i els inhibidors de la fluorescència. Les seqüències exactes tant de sondes com d'encebadors no són facilitades per part de la casa comercial.

Les referències per a cada TaqMan Validated SNP Genotyping Assay Mix, juntament amb els al·lells que identifica cada fluorocrom són les següents:

- g.1166A>C del gen *AGTR1*: C\_3187716\_10 (**A**=VIC<sup>®</sup>, **C**= FAM<sup>®</sup>)
- p.M235T del gen *AGT*: C\_1985481\_20 (**T**=VIC<sup>®</sup>, **C**= FAM<sup>®</sup> a la seqüència nucleotídica de DNA. Es correspon a **Met**=VIC<sup>®</sup>, **Thr**= FAM<sup>®</sup> a la seqüència aminoacídica de la proteïna)
- c.186+2053G>A del gen *ACE2*: C\_30604237\_10 (**G**=VIC<sup>®</sup>, **A**= FAM<sup>®</sup>)
- c.439+4C>T del gen *ACE2*: C\_2551626\_1 (**C**=VIC<sup>®</sup>, **T**= FAM<sup>®</sup>)
- c.1542-361C>G del gen *ACE2*: C\_8877953\_10 (**G**=VIC<sup>®</sup>, **C**= FAM<sup>®</sup>)

Programa de la PCR (iQ5-iCycler, Bio-Rad):

Etapa inicial: **10 min a 95°C**

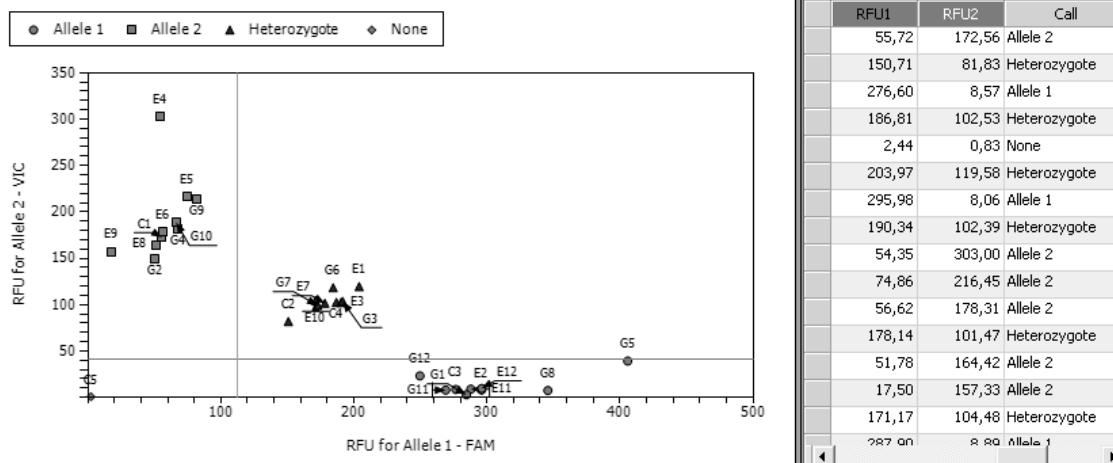
**40 cicles x** Desnaturalització: **15s a 92°C**

Hibridació i extensió: **1 min a 60°C**

L'amplificació del DNA i la lectura de la fluorescència es van dur a terme en un termociclador iCycler amb mòdul iQ<sup>TM</sup>5 (Multicolor Real-time PCR Detection System, Bio-Rad). La interpretació dels resultats de la discriminació al·lèlica va ser efectuada mitjançant el programa informàtic iQ5 2.0 (Standard Edition Optical System Software V2.0, Bio-Rad). Al final de cada cicle es mesura el senyal en unitats relatives de fluorescència (URF) de cada mostra processada. Les URF s'obtenen dividint la fluorescència final entre la fluorescència basal, la qual es considera inespecífica.

Per cada mostra es mesuren les URF del fluorocrom FAM<sup>®</sup> i les URF del fluorocrom VIC<sup>®</sup>. Es representen gràficament (*imatge 7*): si les fluorescències emeses per ambdós colorants són semblants (màxim 1:1,5) és que es tracta d'un pacient heterozigot per l'SNP estudiat; mentre que si només s'emet fluorescència d'un dels colorants, es tracta d'un pacient homozigot per la variant que determina aquest colorant. A efectes pràctics l'homozigosi s'adjudica a senyals de fluorescència amb relació 1:3.

S'obtenen tres núvols de punts que determinen: l'homozigosi per la variant marcada amb FAM<sup>®</sup> si es troben situats sobre un dels eixos, l'homozigosi per la variant marcada amb VIC<sup>®</sup> si es troben sobre l'altre eix i l'heterozigosi quan es troben situats a la diagonal (*imatge 7*). Sempre ha d'afegir-se una mostra que no contingui DNA (aigua) que se situarà al punt d'encreuament dels eixos de coordenades. Si l'aigua presenta fluorescència, és signe de senyal inespecífic o bé de contaminació i els resultats de la PCR no són vàlids perquè aquests fenòmens podrien estar afectant també les altres mostres dels pacients.



**Imatge 7.** Gràfica que representa en abscesses les URF del fluorocrom FAM<sup>®</sup> i en ordenades les URF del fluorocrom VIC<sup>®</sup>. S'observen els tres núvols de punts que determinen els homozigots per cada una de les variants (Allele 1 i Allele 2) i els heterozigots (Heterozygote), i el control negatiu (None) que es troba a l'origen de l'eix de coordenades.

### 3.4.3.3 PCR a temps real amb corbes de dissociació

Ja s'ha comentat a l'apartat anterior que la metodologia de PCR a temps real es caracteritza per la inclusió de fluorocroms durant el procés d'amplificació del DNA. A diferència del cas anterior on s'utilitzaven sondes específiques, la tècnica de corbes de dissociació està basada en fluorocroms inespecífics. En aquest cas s'empra el SYBR Green, un colorant que emet fluorescència quan s'uneix al DNA de doble cadena i que s'afegeix a la barreja de la reacció. Després de l'amplificació, el producte de la PCR se sotmet a una corba de dissociació o fusió de les cadenes mitjançant un augment progressiu de la temperatura. A mesura que la temperatura va augmentant, les cadenes de DNA van separant-se i s'allibera el colorant que deixa d'emetre fluorescència. La temperatura de dissociació o fusió ( $T_m$ ) depèn de la llargada de la cadena de DNA amplificada i de la seva composició de guanines i citosines; és a dir, si s'obtenen fragments de DNA suficientment diferents, la  $T_m$  els caracteritza.

Seqüència dels encebadors	
PCR1	f: 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' r: 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTG GTC AGA T-3'
PCR2, confirmatòria	f: 5'-TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC-3' r: 5'-TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA-3'

**Taula 4:** Seqüències 5' – 3' dels encebadors emprats per la determinació del polimorfisme I/D de l'ACE1. F és l'encebador forward, i r el reverse.

Per l'anàlisi del polimorfisme **I/D de l'ACE1**, es realitza una primera PCR (PCR1) que produeix un fragment de 490 pb en presència de la zona d'inserció (al·lel I), i un fragment de 190 pb en absència de la mateixa (al·lel D). Degut a l'amplificació preferent de l'al·lel D sobre l'al·lel I, totes les mostres identificades com a DD se sotmeten a una segona amplificació específica (PCR2), on un dels encebadors es troba dins de la zona d'inserció (*taula 4*). En aquest cas, només s'observa amplificació de les mostres portadores d'al·lel I, les quals són reclassificades com a ID. Les condicions metodològiques d'ambdues PCR es poden consultar a la *taula 5*.

	PCR1	PCR2
<b>Polimerasa (Bio-Rad)</b>	iTaq	iTaq
<b>Temperatura d'hibridació</b>	60°C	65°C
<b>Temperatura de fusió (<math>T_m</math>)</b>	Al·lel D: 83,5°C	Al·lel D: cap pic
	Al·lel I: 89,5°C (pic primari) 85,5°C (pic secundari)	Al·lel I: 86,5°C

**Taula 5.** Condicions metodològiques de la PCR inicial (PCR1) i de la confirmatòria (PCR2) per determinar el polimorfisme I/D del gen de l'ACE.

La barreja de la reacció de la PCR (tant de la 1 com de la 2) a les concentracions finals indicades, en un volum de 25 µL és:

- **MgCl<sub>2</sub>** 3 mmol/L
- **KCl** 50 mmol/L
- **Tris-HCl** a pH 8,30 20 mmol/L
- **Trifosfodesoxiribonucleòtids** (dNTPs) 200 µmol/L de cada tipus
- **Encebadors** específics 320 nmol/L de cada un
- **Polimerasa:** iTaq 25 U/mL (Bio-Rad)
- **SYBR Green I**
- Mostra d'**ADN** entre 50 i 200 ng (2-8 ng/µL)

El colorant SYBR Green I i la polimerasa iTaq juntament amb MgCl<sub>2</sub>, KCl, Tris-HCl i dNTPs formen part d'una barreja que es comercialitza preparada com a *iQ<sup>TM</sup> Supermix SYBR<sup>®</sup> Green (2x)* de Bio-Rad. A aquesta solució només cal afegir-hi els encebadors, la mostra d'ADN i completar al volum final de 25µL amb aigua estèril.

Programa de la PCR (iQ5-iCycler, Bio-Rad):

Etapa inicial: **4 min a 96°C**

**35 cicles x**                      desnaturalització: **10s a 94°C**  
    hibridació dels encebadors: **25s a T<sub>h</sub>**  
    extensió de la cadena: **25s a 72°C**

Etapa final: **5 min a 72°C**

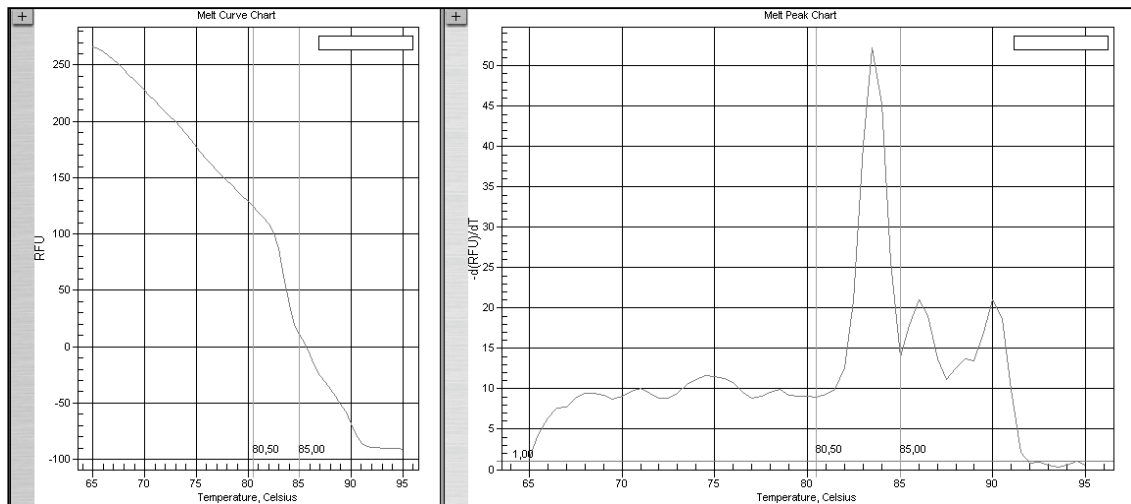
Corba de fusió: **de 65 a 95°C amb augment de 0,5°C cada 15 s**

La T<sub>h</sub> és la temperatura d'hibridació dels encebadors al motlle de DNA.

El programa informàtic iQ5<sup>®</sup> (Biorad) mostra els resultats representant gràficament el descens de la fluorescència expressat en URFs a l'eix de les ordenades i la temperatura a l'eix de les abscisses. La corba de fusió és sempre decreixent perquè a mesura que va augmentant la temperatura, la cadena bicatenària de DNA es va obrint i el SYBR-green s'allibera, perdent la fluorescència.

Si es calcula la primera derivada de la fluorescència en funció de la temperatura s'obté una nova gràfica on apareixen pics corresponents als punts d'inflexió originals (*Imatge 8*). D'aquesta forma es poden identificar amb molta exactitud les temperatures de fusió.





**Imatge 8:** Gràfiques que analitzen els resultats de la PCR a temps real del polimorfisme I/D del gen ACE1. La corba de fusió de l'esquerra representa les RFU en funció de la temperatura, mentre que la corba de la dreta representa la primera derivada de la fluorescència respecte la temperatura. A la imatge s'observen els tres pics característics d'un individu heterozigot ID.

### 3.4.4 Procediments de mesura emprats

Per mesurar les magnituds necessàries per desenvolupar aquesta tesi s'han emprat els següents procediments de mesura:

**Srm—Creatinini; c.subst.:** espectrometria d'absorció molecular a 505 i 570 nm. Procediment de lectura a diferents punts (voltes 30 i 37) a 37 °C. Mètode de Jaffé, sense desproteïnitació, amb blanc de mostra i compensat. El mètode s'ha estandarditzat per IDMS (*Isotopic Dilution Mass Spectrophotometry*). Analitzador Modular System (Roche).

**Srm—Colesterol; c.subst.:** espectrometria d'absorció molecular a 505 i 700 nm. Lectura a 1 punt (volta 50) a 37 °C, pH=6,8. Reacció de la colesterol esterasa/colesterol oxidasa/peroxidasa. Analitzador Modular System (Roche).

**Srm—Albúmina; c.massa:** Espectrometria d'absorció molecular a 570 i 505 nm. Procediment de lectura a dos punts (voltes 22 i 27) a 37 °C. Verd de bromocresol a pH=4,1. Analitzador Modular System (Roche).

**Pac(Uri)—Excreció de proteïna; cabal massa(24h):** Espectrometria d'absorció molecular a 505 i 700 nm. Procediment de lectura a dos punts (voltes 16 i 34) i a 37 °C. Turbidimetria amb clorur de bensenoni. Analitzador Modular System (Roche).

**Srm—Triglicèrid; c.subst.:** Espectrometria d'absorció molecular a 505 i 700 nm. Procediment de lectura a un punt (volta 34) a 37 °C. Mètode: Glicerol-fosfat-oxidasa i peroxidasa, pH=7,6. Analitzador Modular System (Roche).

**San—Eritròcits; fr.vol.(hematòcrit):** Citometria de flux per impedanciometria. Analitzador Pentra (ABX).

**San—Leucòcits; c.núm:** Citometria de flux per Impedanciometria. Analitzador Pentra (ABX).

**San—Hemoglobina; c.massa:** Espectrometria. Lectura d'absorbància a 540 nm pel mètode de la cianmetahemoglobina. Analitzador Pentra (ABX).

**Hb(san)—Hemoglobina A1c; fr.subst:** Cromatografia en fase líquida d'alta eficàcia en gradient d'eluent. La detecció de les diferents fraccions eluïdes es realitza llegint les absorbàncies a 415 nm mitjançant espectrometria d'absorció molecular. El càlcul del percentatge de l'hemoglobina A1c (HbA1c) respecte a l'hemoglobina, es fa dividint l'àrea d'integració del pic corresponent a l'Hb A1c per l'àrea total del cromatograma. Analitzador Adams.

### 3.4.5 Estadística i programes informàtics

Per la manipulació de les bases de dades i els càlculs estadístics es va emprar l'Excel (Microsoft) i l'SPSS, versió 14.0 per Windows (SPSS, Chicago, US). Es va considerar significativa una  $p < 0,05$ .

Per la interpretació dels resultats de la PCR a temps real es va treballar amb el programa Bio-Rad iQ5 Optical System Software v. 2.0.

Donada la gran quantitat de variables de control que s'han recollit, en tots els casos s'ha optat per fer models univariants per cada una de les possibles variables de control i escollir només les que van mostrar diferències estadísticament significatives per introduir-les als models multivariants.

Fonamentalment, es van emprar les eines estadístiques que es detallen a continuació:

#### 3.4.5.1 Anàlisi de la supervivència

L'anàlisi de la supervivència permet descriure les probabilitats d'esdeveniment i evolució de la taxa d'incidència d'un succés al llarg d'un seguiment. Entre aquestes tècniques, hi ha proves no paramètriques per comparar **corbes de supervivència (prova de log-rank)** i models de regressió que permeten valorar l'efecte d'un conjunt de factors pronòstics. Un dels més coneguts és el model de **regressió de riscos proporcionals de Cox**.

La representació gràfica més habitual de la supervivència és la de **Kaplan-Meier**. Representa una funció decreixent, amb salts discontinus a la dreta, que representa les probabilitats de supervivència al llarg del temps. Els salts corresponen a cada temps complet, i les creus (+) marquen els temps censurats o lliures del succés, en el nostre cas, els individus retirats vius de l'estudi.

Per altra banda, el model de regressió de Cox permet identificar i avaluar la relació entre un conjunt de variables predictives i la taxa d'incidència de l'esdeveniment d'interès, anomenada taxa de risc (*hazard rate*) i mesurada mitjançant el coeficient de regressió  $e^{\beta}$ .  $e^{\beta}$  és el factor pel qual es multiplica la taxa instantània de risc quan la variable X s'incrementa en 1 unitat. Si es vol calcular com canvia Y quan X augmenta en més d'1 unitat, s'ha d'**elevant** el coeficient de regressió  $e^{\beta}$  al nombre d'unitats que canvia X.

En el present treball s'ha emprat aquesta metodologia no només per avaluar la mortalitat dels pacients en diàlisi sinó també en l'estudi de la progressió de la nefropatia, prenent com a punt final el canvi d'estadi d'insuficiència renal crònica, l'increment del 100% de la concentració de creatinini en el plasma o bé la disminució a la meitat de la velocitat de filtració glomerular (consulteu l'apartat 3.2).

#### **3.4.5.2 Regressió lineal múltiple**

La regressió lineal múltiple permet analitzar la relació entre una variable dependent quantitativa i diverses variables independents quantitatives o categòriques. La inclusió d'altres variables anomenades "de control" és d'un gran interès en estudis no experimentals com el que ens ocupa, ja que a diferència dels assaigs clínics, les condicions que envolten els pacients no poden ser degudament controlades.

L'efecte que té una variable independent sobre la dependent es mesura a través del coeficient de regressió  $\beta$ , el qual representa el canvi esperat de la variable dependent Y quan la variable independent X s'incrementa en una unitat i totes les altres variables independents del model romanen constants. Si es vol calcular com canvia Y quan X incrementa més d'una unitat, s'ha de **multiplicar** el coeficient de regressió  $\beta$  pel nombre d'unitats que canvia X.

En el present treball, aquesta metodologia s'ha emprat per avaluar la progressió de la nefropatia, prenent com a variable dependent el pendent i la diferència relativa anual tant de la concentració de creatinini en el plasma com de la velocitat de filtració glomerular.

#### **3.4.5.3 Regressió logística binària múltiple**

La regressió logística permet relacionar una variable dependent categòrica amb diverses variables independents quantitatives o binàries. Permet també la inclusió de variables de control.

El coeficient de regressió  $e^{\beta}$  és el factor pel qual es multiplica la odds de la resposta quan la variable independent s'incrementa en una unitat.

En el present treball, aquesta metodologia s'ha emprat únicament per l'estudi preliminar de la susceptibilitat a la nefropatia dels pacients diabètics de tipus 2.

### 3.4.6 Adreces d'Internet

#### Base de dades dels polimorfismes en el gen de l'ACE2

Tota la informació relativa als polimorfismes s'ha extret de la base de dades de la National Center for Biotechnology Information (NCBI) - National Institutes of Health (NIH) dels Estats Units: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Concretament s'ha consultat la base de dades *dbSNP*, que inclou substitucions d'una sola base nucleotídica així com també delecions i insercions de petita escala. En aquesta base s'ha obtingut el número *rs* (reference SNP) i la localització del polimorfisme dins del cromosoma seguint les fonts de *reference assembly*, la seqüència del genoma humà que es considera de referència. La nomenclatura dels polimorfismes s'ha obtingut de la *dbGenBank*, base de dades de disponibilitat pública de seqüències genètiques del NIH.

També s'ha obtingut informació a partir del **International HapMap Project**: <http://www.hapmap.org/>. L'objectiu principal d'aquest organisme és desenvolupar un mapa dels haplotips del genoma humà. Es calcula que hi ha uns 10 milions de polimorfismes. El projecte HapMap s'ocupa d'identificar entre 200.000 i 1 milió de polimorfismes que donin exactament la mateixa informació que els 10 milions, facilitant així enormement la feina de la comunitat científica.

#### Base de dades d'enzims de restricció

Webcutter 2.0, Max Heiman: <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>

#### Pel disseny dels encebadors:

- Steve Rozen and Helen J. Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386. <http://primer3.sourceforge.net/>

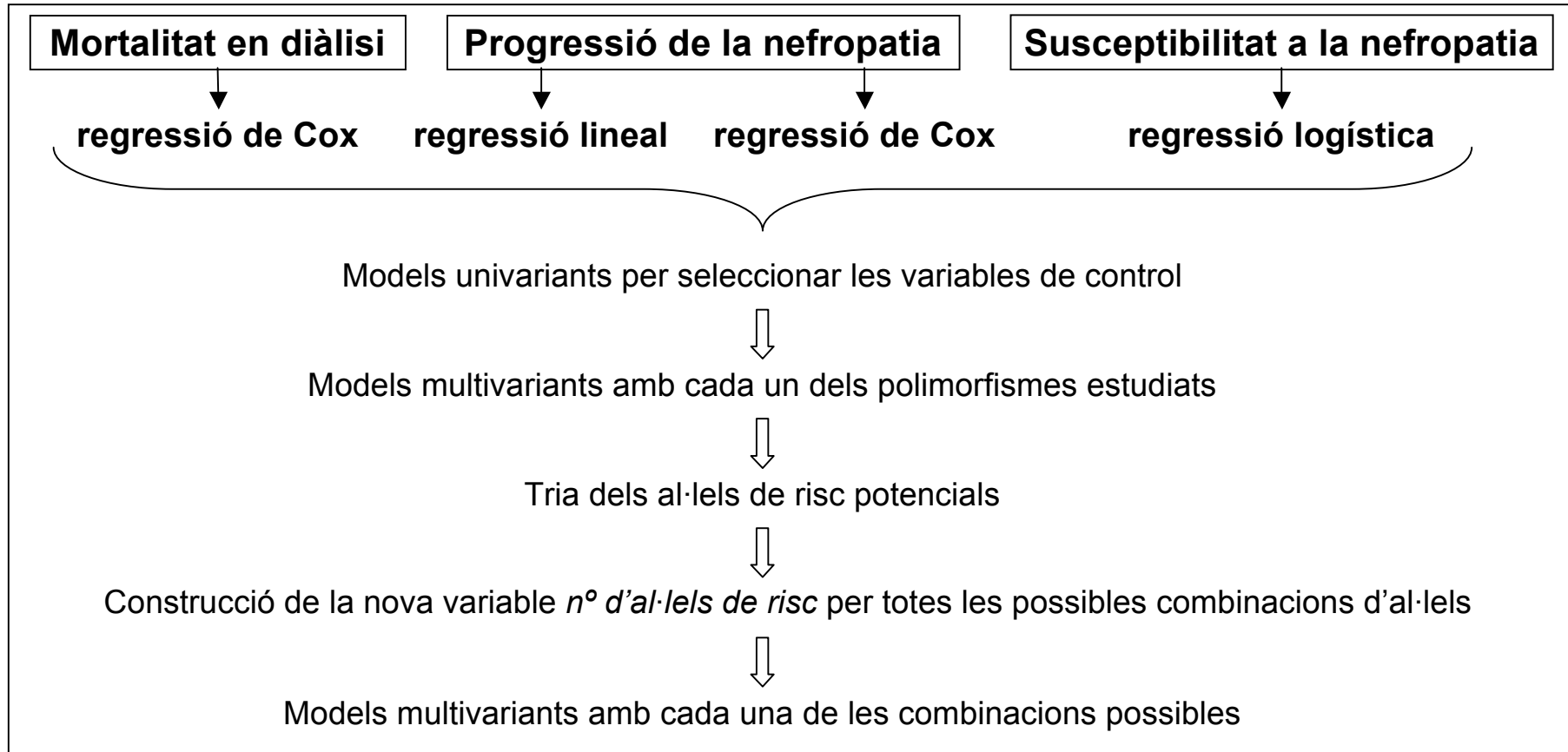
- Web Primer: DNA and Purpose Entry.  
<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>

## **4. RESULTATS**



## ESQUEMA DE LA PRESENTACIÓ DELS RESULTATS

Per a tots els apartats de resultats presentats en aquesta tesi, s'ha seguit el mateix plantejament:



## 4.1 MORTALITAT EN DIÀLISI

### 4.1.1 Descripció de la població

L'estudi de la mortalitat s'ha realitzat amb una població de raça blanca de 100 pacients diabètics de tipus 2 amb nefropatia, que han entrat al programa de diàlisi de l'Hospital Universitari de Bellvitge entre els anys 1993 i 2008.

La població estava composta per 56 homes i 44 dones. El 56% van patir algun tipus d'accident cardiovascular previ a la instauració de la diàlisi i el 54% presentava història d'hipertensió prèvia no controlada. La mitjana de la velocitat de filtració glomerular (MDRD) a la primera visita al nefròleg de l'hospital fou de 38,7 (35,1 - 42,4) mL/min/1,73 m<sup>2</sup>. En aquest punt, la mitjana d'edat era de 63,1 (61,1 - 65,2) anys.

El 25% de pacients van iniciar diàlisi peritoneal mentre que pel 75% restant es va optar per l'hemodiàlisi. En el moment d'instaurar la diàlisi, es van recollir una sèrie de dades que es poden consultar a la *taula 6*.

Magnitud	Mitjana (IC 95%)
Edat (anys)	68,2 (66,4 – 70,1)
VFG residual (mL/min/1,73 m <sup>2</sup> )	8,7 (8,0 - 9,3)
San—Leucòcits (x10 <sup>9</sup> /L)	8,7 (8,0 – 9,3)
San—Hemoglobina (g/L)	117,5 (113,3 – 121,6)
Srm—Colesterol (mmol/L)	4,5 (4,3 – 4,7)
Srm—Albúmina (g/L)	38,1 (37,0 – 39,2)
Hb(San)—Hemoglobina A1c (%)	6,5 (6,3 – 6,8)

*Taula 6. Mitjana i interval de confiança del 95% (IC 95%) de les característiques recollides a la instauració del tractament amb diàlisi.*

La mitjana del temps de seguiment d'aquests pacients va ser de 1147 (994 – 1300) dies, amb un màxim de 3811 dies (10,4 anys), durant el qual 53 pacients van morir, 3 van ser sotmesos a trasplantament renal i 4 van abandonar l'estudi. Es va considerar la data de finalització de l'estudi el dia 16 d'octubre de 2008, i tots els temps van ser truncats en aquest moment.

Les freqüències genotípiques dels 6 polimorfismes estudiats en la població en diàlisi es troben a la *taula 7*. En tots els casos es compleix l'equilibri de Hardy-Weinberg, el qual es va comprovar mitjançant la prova de  $\chi^2$  de comparació de proporcions. Donat que el gen *ACE2* es troba al cromosoma X, les dones tenen dos al·lells però els homes només en tenen un. Per simplificar la presentació dels resultats d'ara en endavant, tractarem els homes com a homozigots quan s'analitzin conjuntament amb les dones.



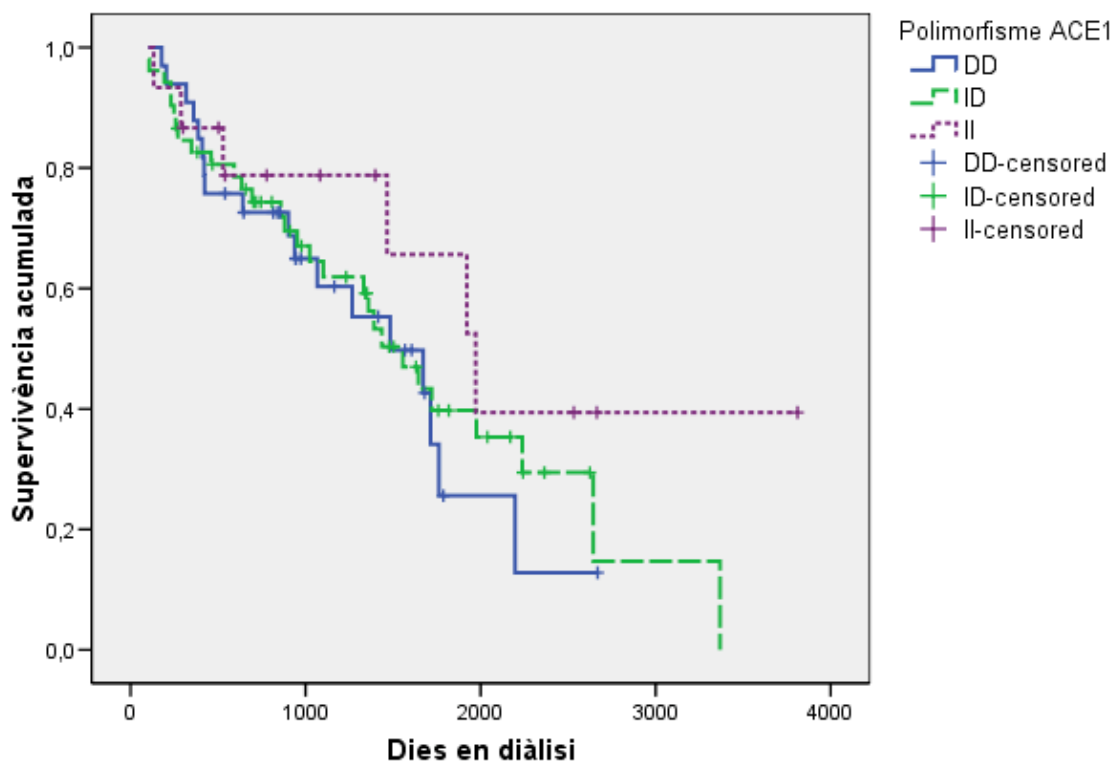
Polimorfisme	Freqüències genotípiques (%)			$p$ ( $\chi^2$ )	
ACE1	DD (33)	ID (52)	II (15)	0,756	
AGT	MM (32)	MT (56)	TT (11)	0,185	
AGTR1	AA (53)	AC (43)	CC (4)	0,402	
ACE2 c.186+2053G>A	dones:	AA (55)	AG (35)	GG (10)	0,742
	homes*:	A (68)	G (32)	-	-
ACE2 c.439+4C>T	dones:	CC (65)	CT (30)	TT (5)	0,925
	homes*:	C (76)	T (24)	-	-
ACE2 c.1542-361C>G	dones:	GG (10)	GC (40)	CC (50)	0,956
	homes*:	G (28)	C (72)	-	-

**Taula 7.** Freqüències genotípiques -expressades en percentatge- dels 6 polimorfismes genotipats en la població en diàlisi, acompanyades de la significació estadística en la comparació de proporcions (prova de  $\chi^2$ ) obtinguda al comprovar l'equilibri de Hardy-Weinberg.

\*en els homes, les distribucions són al·lèliques en lloc de genotípiques

#### 4.1.2 Corbes de supervivència

La representació gràfica de les corbes de supervivència de Kaplan-Meier individuals per cada genotip, es poden veure a les figures 3 - 11, juntament amb la significació de la prova de Log Rank (altrament anomenada de Mantel-Cox) per la comparació de corbes de supervivència.



**Figura 3.** Corba de supervivència del polimorfisme I/D del gen ACE1 ( $p = 0,198$ ).

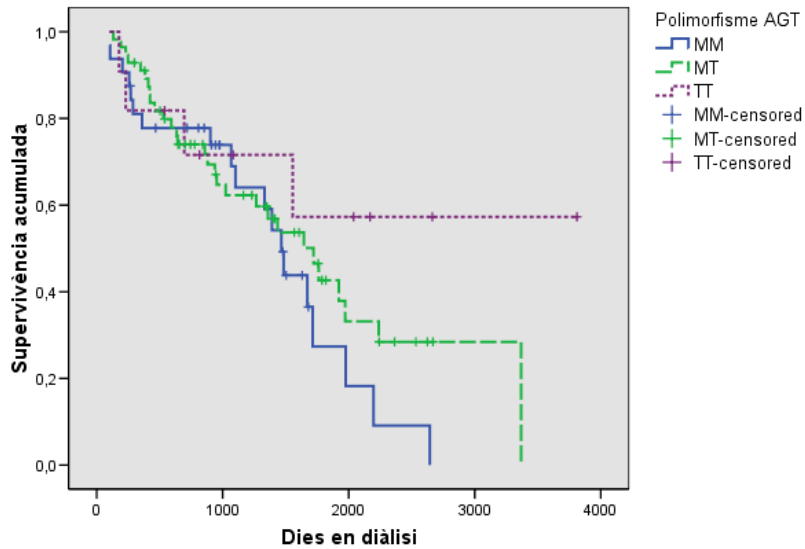


Figura 4. Corba de supervivència del polimorfisme p.M235T del gen AGT ( $p = 0,076$ ).

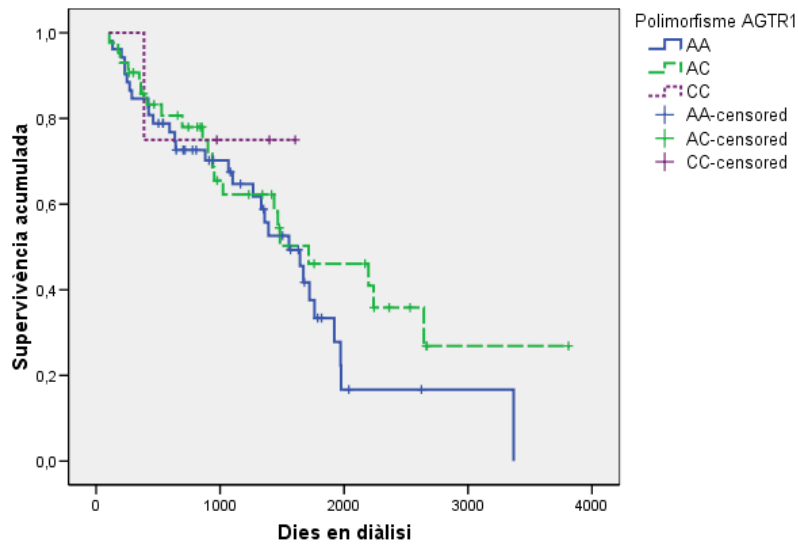


Figura 5. Corba de supervivència del polimorfisme g.1166A>C del gen AGTR1 ( $p = 0,189$ ).

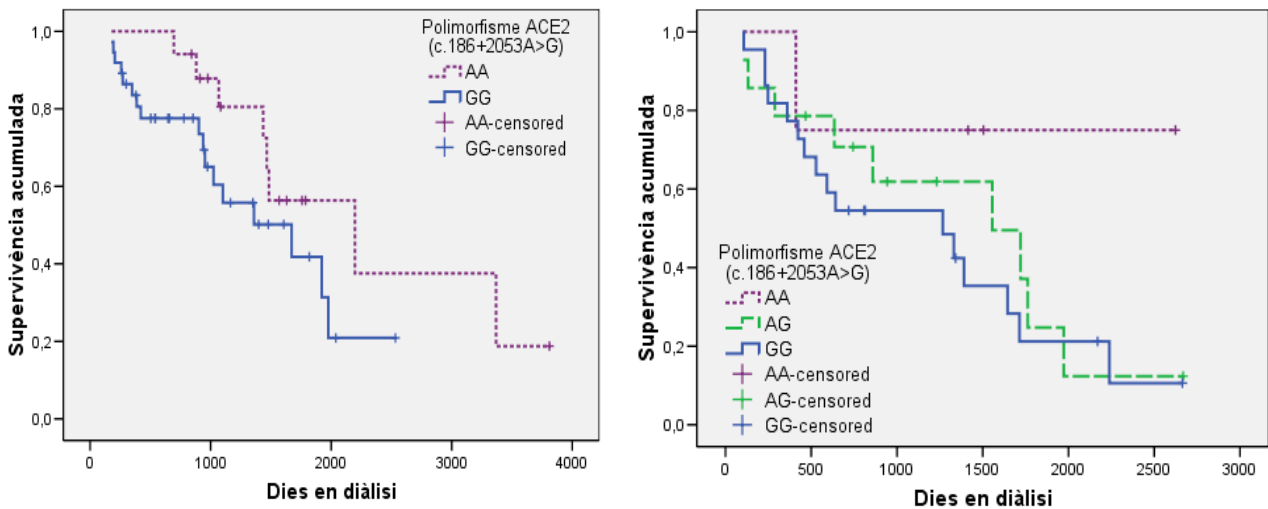
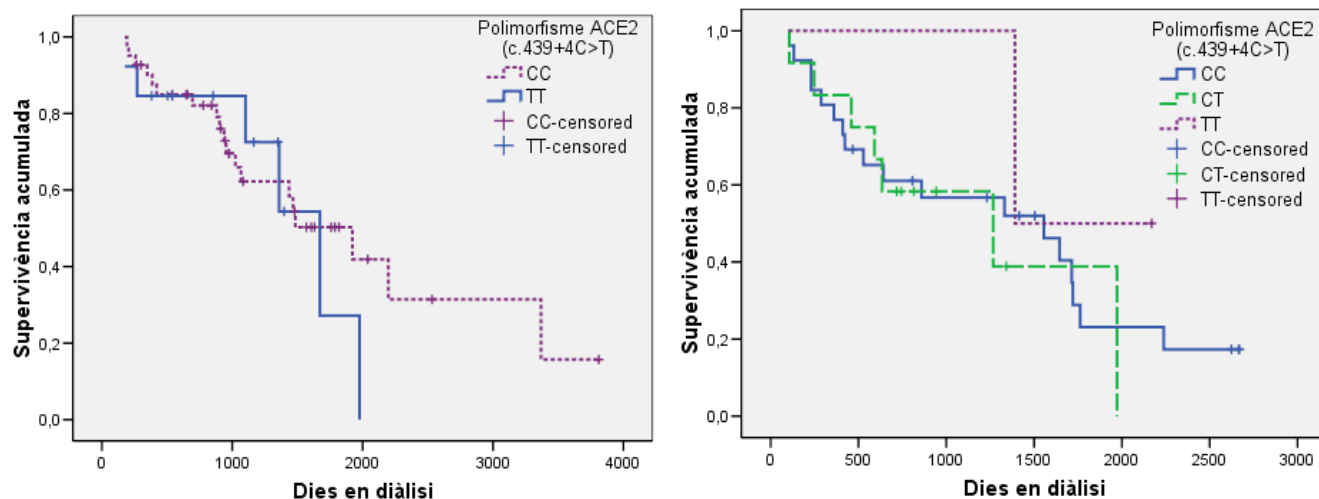
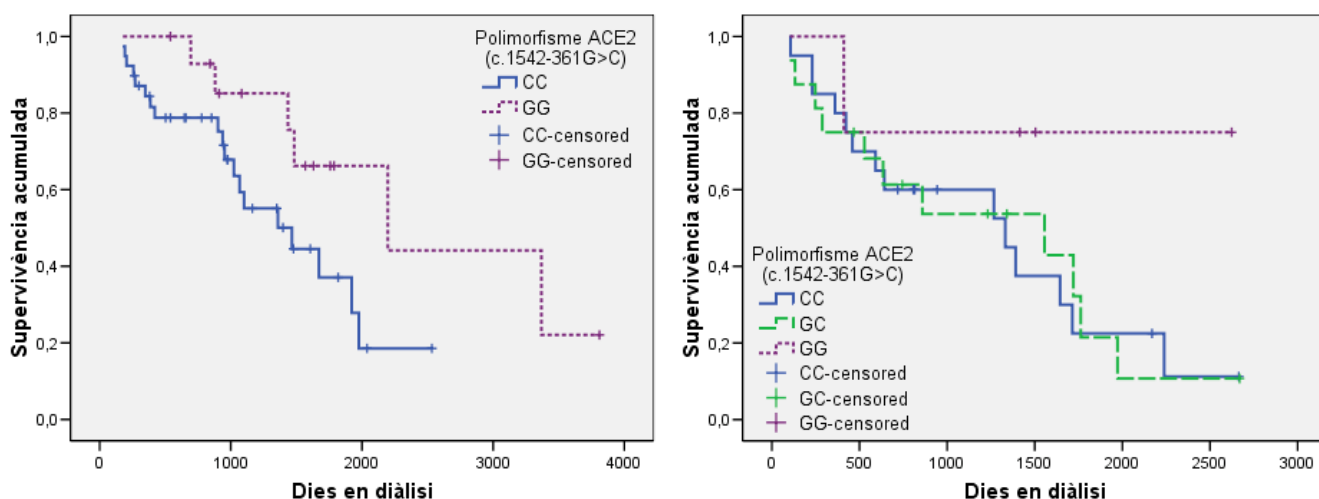


Figura 6. Corba de supervivència del polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 en homes (corba de l'esquerra,  $p = 0,134$ ) i en dones (corba de la dreta,  $p = 0,317$ ).



**Figura 7.** Corba de supervivència del polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2 en homes (corba de l'esquerra,  $p = 0,559$ ) i en dones (corba de la dreta,  $p = 0,655$ ).



**Figura 8.** Corba de supervivència del polimorfisme c.1542-361G>C del gen ACE2 en homes (corba de l'esquerra,  $p = 0,058$ ) i en dones (corba de la dreta,  $p = 0,379$ ).

Per a cada polimorfisme, la línia puntejada correspon al genotip que presenta una major supervivència en diàlisi. Les diferències entre genotips no han resultat estadísticament significatives, encara que pels polimorfismes p.M235T del gen AGT i c.1542-361G>C del gen ACE2 –en homes– han estat ratllant la significació ( $p=0,076$  i  $p=0,058$ , respectivament).

En base a les tendències observades a les corbes de supervivència es pot intuir que els al·lels **D** (I/D), **M** (p.M235T), **A** (g.1166A>C), **G** (c.186+2053G>A) i **C** (c.1542-361G>C) confereixen un mal pronòstic de supervivència. Pel que fa al polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2, les corbes de supervivència de cada genotip s'entrecreuen i esdevé molt difícil distingir quin és l'al·lel de risc.

## 4.1.3 Regressions de Cox

### 4.1.3.1 Models univariants

Els possibles factors que hem considerat que poden estar relacionats directament amb el temps de supervivència en diàlisi, i que ja s'han comentat a l'apartat 3.1.1 són:

- sexe
- edat a l'inici de diàlisi
- tipus de diàlisi: hemodiàlisi o diàlisi peritoneal
- comorbiditat en forma d'episodis cardiovasculars previs a la diàlisi
- velocitat de filtració glomerular a la primera visita, que dóna idea de si la remissió a l'especialista es massa tardana (VFG basal).
- velocitat de filtració glomerular residual a l'inici del tractament amb diàlisi
- història d'hipertensió prèvia
- San—Leucòcits; c.núm.
- San—Hemoglobina; c.massa
- Srm—Albúmina; c.massa
- Srm—Colesterol; c.subst
- Hb(San)—Hemoglobina A1c; fr.subst

Per tal de decidir quines d'aquestes possibles variables de control és necessari que s'introdueixin als models de Cox definitius –els que mesuren l'efecte dels polimorfismes–, s'han efectuat regressions de Cox univariants (*taula 8*).

Magnitud	e <sup>β</sup> (IC 95%)
tipus de diàlisi	0,65 (0,37 a 1,34)
comorbiditat	0,87 (0,51 – 1,50)
VFG basal	1,00 (0,98 – 1,01)
VFG residual	0,96 (0,87 – 1,06)
hipertensió	0,98 (0,56 – 1,72)
San—Leucòcits; c.núm.	1,02 (0,94 – 1,09)
San—Hemoglobina; c.massa	0,99 (0,97 – 1,00)*
Srm—Albúmina; c.massa	0,92 (0,87 – 0,97)*
Hb(San)—Hemoglobina A1c; fr.subst	1,11 (0,90 – 1,37)
Srm—Colesterol; c.subst	0,87 (0,69 – 1,10)

**Taula 8.** Coeficients de regressió i intervals de confiança del 95% (IC 95%) de les possibles variables de control en els models de regressió univariants.

\*Variable que compleix els criteris d'inclusió al model definitiu.

S'ha decidit la inclusió d'aquelles variables per les quals l'interval de confiança de la taxa de risc del model univariant no inclou l'1. Per concepte, l'edat i el sexe s'han inclòs independentment dels resultats dels models univariants.

Únicament la concentració d'albúmina en el plasma i la concentració d'hemoglobina a la sang s'han mostrat relacionades de forma estadísticament significativa amb el risc de mortalitat dels pacients diabètics de tipus 2 en diàlisi. El límit superior de l'interval que estima el coeficient de regressió de l'efecte de l'hemoglobina està arrodonit a 1,00 però de fet no inclou aquest terme. Per a ambdues magnituds la relació és inversa, és a dir, a major concentració d'albúmina o d'hemoglobina, menys probabilitat de morir en diàlisi.

#### **4.1.3.1 Regressions independents per cada polimorfisme**

A continuació s'ha analitzat l'efecte que produeix cada polimorfisme sobre la mortalitat dels pacients diabètics de tipus 2 en diàlisi. S'han executat models de regressió que s'obtenen incloent a l'equació la variable genètica juntament amb les quatre variables de control que hem considerat prèviament (edat, sexe, S<sub>rm</sub>—Albúmina; c.massa i S<sub>an</sub>—Hemoglobina; c.massa). Tot i això, a les taules d'aquest apartat només es mostren aquelles variables de control que han presentat un coeficient de regressió estadísticament significatiu, amb l'únic objectiu de simplificar-ne la visualització. Els guions signifiquen variables no significatives.

##### **ACE1**

Amb el model ajustat per les variables de control, el risc estimat de mort dels pacients amb genotip DD és de 3,5 vegades el dels pacients amb genotip II (IC95% = 1,3 a 9,9), i pels pacients amb genotip ID el risc de morir respecte els de genotip II és de 2,5 vegades més. La significació estadística és 0,017 i 0,059 respectivament (*taula 9a*).

##### **AGT**

El model ajustat per les variables de control estima un risc d'èxitus dels pacients amb genotip MM de 3,8 vegades el dels pacients amb genotip TT, i pels pacients MT, de 2,9 vegades el dels pacients amb genotip TT. L'efecte del genotip MM sobre el TT és estadísticament significatiu ( $p=0,025$ ) (*taula 9b*).

a)

Variables	$e^{\beta}$ (IC 95%)	$p$
ACE1 (DD vs II)	3,5 (1,3 – 9,9)	0,017
ACE1 (ID vs II)	2,5 (1,0 – 6,3)	0,059
Edat a l'inici de diàlisi	1,04 (1,00 – 1,07)	0,031
Srm—Albúmina; c.massa	0,92 (0,86 – 0,98)	0,008

b)

Variables	$e^{\beta}$ (IC 95%)	$p$
AGT (MM vs TT)	3,8 (1,2 – 12,4)	0,025
AGT (MT vs TT)	2,9 (1,0 – 8,7)	0,058
Srm—Albúmina; c.massa	0,92 (0,86 – 0,98)	0,009

c)

Variables	$e^{\beta}$ (IC 95%)	$p$
AGTR1 (AA vs C)	1,4 (0,8 – 2,5)	0,239
Srm—Albúmina; c.massa	0,94 (0,89 – 1,00)	0,043

d)

Variables	homes (G vs A)		dones (GG vs A)	
	$e^{\beta}$ (IC 95%)	$p$	$e^{\beta}$ (IC 95%)	$p$
c.186+2053G>A	1,8 (0,7 – 4,5)	0,195	1,4 (0,6 – 3,2)	0,433
Srm—Albúmina; c.massa	0,92 (0,85 – 1,00)	0,040	-	-

e)

Variables	homes (T vs C)		dones (T vs CC)	
	$e^{\beta}$ (IC 95%)	$p$	$e^{\beta}$ (IC 95%)	$p$
c.439+4C>T	1,5 (0,6 – 3,9)	0,439	1,2 (0,5 – 3,0)	0,745
Srm—Albúmina; c.massa	0,91 (0,84 – 0,99)	0,027	-	-

f)

Variables	homes (C vs G)		dones (CC vs G)	
	$e^{\beta}$ (IC 95%)	$p$	$e^{\beta}$ (IC 95%)	$p$
c.1542-361C>G	2,0 (0,7 – 5,8)	0,184	1,0 (0,4 – 2,2)	0,960

**Taula 9.** Coeficient de regressió de Cox ( $e^{\beta}$ ) interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model que mesura l'efecte sobre la mortalitat:

- dels genotips DD i ID del polimorfisme I/D del gen ACE1 respecte el genotip II
- dels genotips MM i MT del polimorfisme M268T del gen AGT respecte el genotip TT
- del genotip AA del polimorfisme g.1166A>C del gen AGTR1 respecte els portadors de l'al·lel C.
- de l'al·lel G del polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 respecte l'al·lel A en homes i de les homozigotes GG respecte les portadores de l'al·lel A en dones.
- de l'al·lel T del polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2 respecte l'al·lel C en homes i de les portadores de l'al·lel T respecte les homozigotes CC en dones.
- de l'al·lel C del polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 respecte l'al·lel G en homes, i de les homozigotes CC respecte les portadores de l'al·lel G en dones.

**AGTR1**

En el cas del polimorfisme de l'*AGTR1*, com que únicament hi havia 4 individus amb genotip CC, s'han agrupat els portadors de l'al·lel C. El risc d'èxitus dels pacients amb genotip AA és 1,4 vegades superior al dels portadors de l'al·lel C, per bé que aquest efecte no és estadísticament significatiu (*taula 9c*).

**ACE2**

L'estudi s'ha realitzat separatament per sexes. Per a cada polimorfisme, les dones s'han agrupat en portadores d'un dels al·lells respecte les homozigotes per l'altre, ja que hi havia 4 o menys representants del grup minoritari. Per a aquest mateix grup es dona la circumstància que no hi ha cap variable de control estadísticament significativa.

Tot i que no s'ha trobat en cap cas una relació estadísticament significativa entre els polimorfismes i la mortalitat dels pacients (*taula 9 d-f*), podem destacar que els polimorfismes c.186+2053G>A i c.1542-361C>G, en els homes, mostren la mateixa tendència clara que ja s'observava a les corbes de supervivència; és a dir, que els al·lells G i C, respectivament, semblen de mal pronòstic.

Seguint també amb les conclusions que s'extreien de les corbes de supervivència, el polimorfisme restant (c.439+4C>T) no mostra cap mena de tendència que el pugui relacionar amb la mortalitat.

**4.1.3.3 Regressions combinant polimorfismes**

Tot i que de l'estudi individual només s'ha trobat significació estadística pels polimorfismes I/D i p.M235T, s'han identificat els al·lells que podrien conferir risc d'èxitus per la resta de polimorfismes en base a les tendències coincidents tant de les corbes de supervivència com de les regressions de Cox individuals. Per a seleccionar un al·lel, s'ha pres com a condició que la significació estadística de les regressions fos com a màxim de 0,2. D'aquesta manera, hem classificat els al·lells **D** (I/D), **M** (p.M235T), **G** (c.186+2053G>A) i **C** (c.1542-361C>G) com a al·lells que possiblement confereixen un major risc de morir durant la diàlisi.

Per tal d'estudiar interaccions genètiques s'ha creat una nova variable anomenada "**nombre d'al·lells de risc**" que s'obté sumant el nombre d'al·lells de risc que té cada individu (consulteu l'apartat 3.3). Aquesta variable pot prendre els valors de 0 a 8, el nombre màxim d'al·lells de risc que pot tenir un individu. Recordem que pel que fa als polimorfismes de l'*ACE2* els homes s'han considerat homozigots amb doble aportació al·lèlica. Hi ha 2 pacients sense cap al·lel de risc, n'hi ha 1 que en té un, 5 que en

tenen dos, 12 que en tenen tres, 13 que en tenen quatre, 18 que en tenen cinc, 18 que en tenen sis, 24 que en tenen set i 7 que tenen els vuit.

Seguint punt per punt el procés descrit a l'apartat 3.3, hem realitzat totes les possibles combinacions de 2, 3 i 4 polimorfismes.

Les regressions de riscos proporcionals de Cox mostren una relació significativa entre el nombre d'al·lels de risc i el risc de morir dels pacients diabètics de tipus 2 en diàlisi.

La **combinació de dos polimorfismes** que millor estima el risc de morir és la formada per l'**ACE1** i l'**AGT** (*taula 10*). El risc relatiu de morir es multiplica per 1,5 (IC 95% 1,1-2,0) per cada al·lel de risc de més que té el pacient. La significació estadística és de 0,007. Això significa que el fet de tenir els quatre al·lels de risc respecte no tenir-ne cap fa que es multipliqui per 5 vegades ( $1,5^4$ ) el risc de morir en diàlisi.

La **combinació de tres polimorfismes** que millor estima el risc de morir és la formada per l'**ACE1**, l'**AGT** i el c.186+2053G>A (*taula 11*). El risc relatiu de morir es multiplica per 1,5 (IC 95% 1,2-1,9) per cada al·lel de risc de més que té el pacient. La significació estadística és de 0,002. Això significa que el fet de tenir els sis al·lels de risc fa que el risc de morir sigui 11 vegades ( $1,5^6$ ) més alt respecte no tenir cap al·lel.

L'addició del quart polimorfisme, tot i ser també estadísticament significativa, aporta menys informació que els models previs, ja que el fet de tenir els 8 al·lels de risc explica un augment del risc de morir inferior a la combinació de tres polimorfismes ( $e^\beta=1,3$  (IC 95%: 1,1-1,5)  $p=0,007$ ).

**- Combinació de 2 polimorfismes: D (I/D) + M (p.M235T)**

Variables	$e^\beta$ (IC 95%)	$p$
nº d'al·lels de risc (D+M)	1,5 (1,1 – 2,0)	0,007
Edat a l'inici de diàlisi	1,04 (1,00 – 1,07)	0,039
Srm—Albúmina; c.massa	0,91 (0,85 – 0,98)	0,008

**Taula 10.** Coeficient de regressió de Cox ( $e^\beta$ ) interval de confiança del 95% i significació estadística del nº d'al·lels de risc -**D (ACE1)** i **M (AGT)**- i de les variables de control significatives del model que mesura l'efecte dels al·lels de risc sobre la mortalitat en diàlisi.

**- Combinació de 3 polimorfismes: D (I/D) + M (p.M235T) + G (c.186+2053G>A)**

Variables	$e^\beta$ (IC 95%)	$p$
nº d'al·lels de risc (D+M+G)	1,5 (1,2 – 1,9)	0,002
Srm—Albúmina; c.massa	0,92 (0,87 – 0,98)	0,012

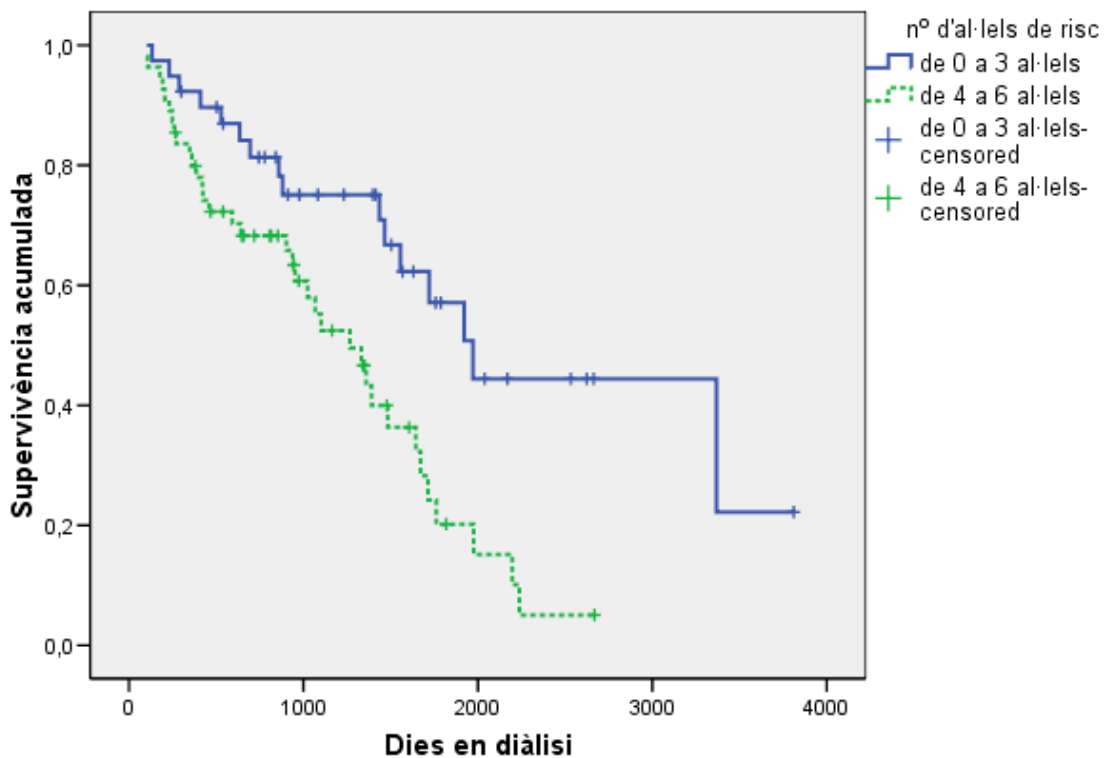
**Taula 11.** Coeficient de regressió de Cox ( $e^\beta$ ) interval de confiança del 95% i significació estadística del nº d'al·lels de risc -**D (ACE1)**, **M (AGT)** i **G (c.186+2053G>A)**- i de les variables de control significatives del model que mesura l'efecte dels al·lels de risc sobre la mortalitat en diàlisi.



Resulta interessant subratllar que les estimacions de les taxes de risc de la nova variable “nº d'al·lels de risc” són molt més bones, ja que l'interval de confiança del 95% és molt més estret.

Per visualitzar la relació dels al·lels de risc **-D (I/D) + M (p.M235T) + G (c.186+2053G>A)-** sobre la mortalitat en diàlisi, hem classificat la població en dos grups en funció de si tenen de 0 a 3 o de 4 a 6 al·lels de risc. La prova de log rank (*figura 9*) mostra diferències estadísticament significatives en la supervivència dels dos grups ( $p=0,002$ ).

A títol descriptiu, direm que el grup que té de 0 a 3 al·lels de risc, ha romàs en diàlisi una mitjana de 2254 (1748-2760) dies –que equival a 6 anys–, mentre que el grup que té més de 3 al·lels de risc, es manté en diàlisi 1214 dies de mitjana (995-1434), el que equival a 3 anys, la meitat de temps que el primer grup.



**Figura 9.** Corba de supervivència de Kaplan-Meier ( $p = 0,002$ ).

— pacients que tenen de 0 a 3 al·lels de risc **-D (I/D) + M (p.M235T) + G (c.186+2053G>A)-**

- - - pacients que tenen de 4 a 6 al·lels de risc **-D (I/D) + M (p.M235T) + G (c.186+2053G>A)-**

## 4.2 PROGRESSIÓ DE LA NEFROPATIA

### 4.2.1 Descripció de la població

L'estudi de la progressió de la nefropatia s'ha realitzat amb 320 pacients diabètics de tipus 2 diagnosticats d'insuficiència renal crònica i atesos pel Servei de Nefrologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge.

Dels pacients inclosos a l'estudi, el 63,8 % eren homes, el 70,3% eren no fumadors i el 83,8% estaven en tractament amb IECA i/o ARAll. El resum de la resta de característiques recollides dels pacients a la primera visita a l'especialista es troben a la *taula 12*.

Magnitud	Mitjana (IC 95%)
Edat (anys)	62,0 (61,0 – 63,1)
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	30,0 (29,4 – 30,5)
MDRD (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	56,0 (54,0 – 58,0)
Srm—Creatinini (µmol/L)	113,7 (110,3 – 117,2)
Pac(Uri)—Excreció de proteïna (g/dia)	1,5 (1,3 – 1,6)
Tensió arterial sistòlica (mmHg)	157,4 (154,6 – 160,3)
Tensió arterial diastòlica (mmHg)	81,5 (80,1 – 82,9)
Srm—Albúmina (g/L)	41,7 (41,1 – 42,2)
Hematòcrit	0,407 (0,400 – 0,413)
Hb(San)—Hemoglobina A1c (%)	7,4 (7,2 – 7,6)
Srm—Colesterol (mmol/L)	5,7 (5,6 – 5,9)
Srm—Triglicèrid (mmol/L)	2,2 (2,0 – 2,4)

**Taula 12.** Mitjana i intervals de confiança del 95% (IC 95%) de les característiques recollides a la primera visita al nefròleg.

Per avaluar la progressió de la nefropatia s'han utilitzat 7 criteris paral·lels (consulteu l'apartat 3.2). L'anàlisi estadística ha estat realitzada en consonància amb les característiques particulars dels criteris esmentats. D'aquesta manera podem presentar els resultats pel que fa a progressió dividits en dos apartats diferents:

#### 1. Pendants i disminucions relatives: MODELS DE REGRESSIÓ LINEAL

El seguiment dels pacients va ser entre 2 i 15 anys. Durant aquest temps, l'increment relatiu de la concentració de creatinini en el plasma va ser de mitjana del 11,0 (9,1 – 12,9) % anual; la disminució relativa de la filtració glomerular va ser de -9,7 (-10,9 a -8,4) % anual; el pendent de l'increment de la concentració de creatinini va ser de 25,2

(19,5 – 30,9) mmol/L per any; i la mitjana del pendent de la disminució de la filtració glomerular va ser de -3,4 (-3,8 a -3,0) mL/min/1,73m<sup>2</sup> anual.

## 2. Criteris que requereixen un seguiment al llarg del temps, fins que té lloc l'esdeveniment d'interès: ANÀLISI DE LA SUPERVIVÈNCIA

Aquests tipus d'anàlisis s'anomenen de forma genèrica *anàlisis de la supervivència*, però és important recordar que són útils per estudiar el risc que es produeixi qualsevol tipus d'esdeveniment. A la progressió de la nefropatia no s'estudia la probabilitat de supervivència de l'individu, sinó el risc que té un individu de perdre amb més rapidesa que un altre la funcionalitat del sistema renal.

La mitjana del temps de seguiment dels pacients va ser de 6,5 (6,1 – 6,8) anys, durant els quals 109 pacients van doblar la concentració de creatinini al plasma (n=320), 111 van disminuir a la meitat l'MDRD (n=320) i 74 van passar al següent estadi d'insuficiència renal crònica (n=212): 4 van passar de l'estadi 5 al 4, 17 pacients van passar de l'estadi 4 al 3 i finalment 53 pacients van passar de l'estadi 3 al 2. La resta de pacients van romandre al mateix estadi d'insuficiència renal crònica al final de l'estudi.

La distribució genotípica dels quatre polimorfismes estudiats es troba en equilibri de Hardy-Weinberg tal com mostra la *taula 13*.

Polimorfisme	Freqüències genotípiques (%)			p ( $\chi^2$ )
ACE1	DD (38,1)	ID (44,7)	II (17,2)	0,506
AGT	MM (32,2)	MT (49,0)	TT (18,8)	0,997
AGTR1	AA (55,4)	AC (38,5)	CC (6,1)	0,939
ACE2 c.186+2053G>A	dones: GG (48,2)	AG (40,7)	AA (11,1)	0,846
	homes*: G (65,0)	-	A (35,0)	-
ACE2 c.439+4C>T	dones: CC (59,3)	CT (34,3)	TT (6,4)	0,872
	homes*: C (81,3)	-	T (18,7)	-
ACE2 c.1542-361C>G	dones: CC (43,5)	GC (41,7)	GG (14,8)	0,911
	homes*: C (65,5)	-	G (34,5)	-

**Taula 13.** Freqüències genotípiques -expressades en percentatge- dels 6 polimorfismes genotípats, acompanyades de la significació estadística en la comparació de proporcions (prova de  $\chi^2$ ) obtinguda al comprovar l'equilibri de Hardy-Weinberg.

\*en els homes, les distribucions són al·lèliques en lloc de genotípiques

## 4.2.2 Regressió lineal

### 4.2.2.1 Models univariants

Primerament hem fet regressions lineals univariants amb cada una de les variables de control descrites anteriorment, per tal de decidir quines s'havien d'introduir al model de regressió definitiu. S'han escollit aquelles variables per les quals l'interval de confiança del coeficient de regressió del model univariant no inclogués el 0, és a dir, que fos estadísticament significatiu. Aquest procés s'ha realitzat per les 4 variables dependents en consideració (*taula 14*).

Per concepte, les variables edat i sexe s'introduiran al model de regressió definitiu independentment dels resultats del model univariant. El mateix passa amb les variables "MDRD basal" i "concentració de creatinini basal"; la situació basal de la nefropatia amb la qual arriba el pacient a la consulta de l'especialista pot determinar la posterior evolució. Donat que els pacients inclosos a l'estudi arriben en estadis d'insuficiència renal diferents (1, 2 i 3) s'ha cregut convenient ajustar sempre el model de regressió per la situació basal.

Magnitud	$\beta$ (IC 95%) pendent MDRD	$\beta$ (IC 95%) dif relat MDRD	$\beta$ (IC 95%) pendent creatinini	$\beta$ (IC 95%) dif relat creatinini
IMC	0 (-0,1 a 0,1)	0,1 (-0,2 a 0,4)	-0,1 (-1,4 a 1,2)	-0,2 (-0,6 a 0,3)
Srm—Albúmina	0,3 (0,2 a 0,4)*	0,9 (0,6 a 1,2)*	-2,9 (-4,2 a -1,6)*	-1,1 (-1,5 a -0,6)*
Hematòcrit	0,16 (0,09 a 0,23)*	0,6 (0,4 a 0,8)*	-1,9 (-2,9 a -1,0)*	-0,7 (-1,1 a -0,4)*
Srm—Triglicèrid	0 (-0,3 a 0,2)	-0,1 (-0,9 a 0,7)	2,5 (-1,1 a 6,0)	0,1 (-1,1 a 1,3)
Tabaquisme	-0,7 (-1,6 a 0,2)	0,2 (-2,6 a 2,9)	2,1 (-10 a 15)	-1,1 (-5,2 a 3,1)
Tractament	-0,6 (-1,8 a 0,5)	-0,3 (-3,7 a 3,1)	2,4 (-13 a 18)	-0,1 (-5,3 a 5,0)

**Taula 14.** Coeficients de regressió i intervals de confiança del 95% (IC 95%) de les possibles variables de control que es mesuren a la **primera visita**, en els models de regressió univariants per cada una de les 4 variables dependents.

\*Variables que compleixen els criteris d'inclusió al model definitiu.

Cal recordar que per les variables de control que tenien un seguiment anual (Srm—Colesterol, Pac(Uri)—Excreció de proteïna, Hb(San)—Hemoglobina A1c, tensió arterial sistòlica i tensió arterial diastòlica) s'han valorat tres possibilitats d'inclusió: 1) la seva mesura basal, 2) la mitjana de totes les mesures recollides, o 3) la integral de la corba que conformen tots els punts o AUC. S'ha escollit el criteri que estima el coeficient de regressió  $\beta$  amb més significació estadística per incloure'l al model definitiu. En general, l'àrea sota la corba és el millor criteri d'avaluació de la progressió de les variables de control de les quals es disposa de seguiment, tal com es pot observar a la *taula 15*.

Magnitud	p pendent MDRD	p dif relat MDRD	p pendent creatinini	p dif relat creatinini
Srm—Colesterol basal	0,14	0,009	0,003	0,003
Srm—Colesterol mitjana	0,001	1,2x10 <sup>-4</sup>	6,0x10 <sup>-5</sup>	1,3x10 <sup>-4</sup>
Srm—Colesterol AUC	5,7x10 <sup>-4</sup> *	6,2x10 <sup>-5</sup> *	6,2x10 <sup>-5</sup> *	7,6x10 <sup>-5</sup> *
Pac(Uri)—Excreció de proteïna basal	2,3x10 <sup>-9</sup>	2,1x10 <sup>-14</sup>	4,2x10 <sup>-8</sup>	3,8x10 <sup>-13</sup>
Pac(Uri)—Excreció de proteïna mitjana	4,3x10 <sup>-43</sup>	1,5x10 <sup>-38</sup>	3,3x10 <sup>-36</sup> *	4,5x10 <sup>-27</sup>
Pac(Uri)—Excreció de proteïna AUC	5,0x10 <sup>-44</sup> *	2,0x10 <sup>-40</sup> *	1,6x10 <sup>-35</sup>	3,6x10 <sup>-28</sup> *
Hb(San)—Hemoglobina A1c basal	3,2x10 <sup>-4</sup> *	0,002 *	0,007 *	0,014 *
Hb(San)—Hemoglobina A1c mitjana	0,024	0,30	0,23	0,53
Hb(San)—Hemoglobina A1c AUC	0,018	0,32	0,30	0,58
Tensió arterial sistòlica basal	2,8x10 <sup>-4</sup>	1,3x10 <sup>-6</sup>	0,002	4,9x10 <sup>-5</sup>
Tensió arterial sistòlica mitjana	3,8x10 <sup>-7</sup>	9,2x10 <sup>-12</sup>	4,0x10 <sup>-6</sup>	2,2x10 <sup>-8</sup>
Tensió arterial sistòlica AUC	1,1x10 <sup>-7</sup> *	1,6x10 <sup>-12</sup> *	1,5x10 <sup>-6</sup> *	4,9x10 <sup>-9</sup> *
Tensió arterial diastòlica basal	0,59	0,56	0,38	0,36
Tensió arterial diastòlica mitjana	0,96	0,36	0,16	0,17
Tensió arterial diastòlica AUC	0,83	0,30	0,18	0,17

**Taula 15.** Significació estadística (p) de les variables de control amb **seguiment anual** en els models de regressió univariants per cada una de les 4 variables dependents possibles.  
\*Variables que compleixen els criteris d'inclusió al model definitiu.

Seguint els criteris que s'han descrit, les **variables de control** que s'inclouran als models de regressió **definitius** seran: edat; sexe; Srm—Albúmina; c.massa; San—Eritròcits; fr.vol.(hematòcrit); Srm—Creatinini; c.subst. basal o bé MDRD basal en funció de si la variable dependent està relacionada amb el creatinini o amb la velocitat de filtració glomerular; l'àrea sota la corba de Srm—Colesterol; c.subst., tensió arterial sistòlica i Pac(Uri)—Excreció de proteïna; cabal massa(24h) (a excepció del model amb el pendent de creatinini com a variable dependent on s'introduirà la mitjana d'aquesta variable); i finalment la mesura basal de Hb(San)—Hemoglobina A1c; fr.subst.

#### 4.2.2.2 Regressions independents per cada polimorfisme

A partir d'aquest punt, es desenvoluparan només els resultats que avaluen l'efecte genètic sobre la progressió de la nefropatia mitjançant el pendent i la diferència anual relativa de la filtració glomerular (vegeu l'apartat 3.2). El mateix desenvolupament ha estat realitzat pels criteris que inclouen directament la mesura de creatinini i s'han obtingut resultats similars encara que estadísticament menys significatius (consulteu l'annex B).

Exceptuant els gens dels cromosomes sexuals, la variable “genotip” té 3 categories: homozigot per un al·lel, heterozigot i homozigot per l’altre al·lel. Com que no es poden introduir variables de més de dues categories en models de regressió lineal, s’han creat dues variable *fictícies* de cada polimorfisme prenent com a referència el genotip que, a priori, sembla protector pel que fa a la progressió de la nefropatia. Així, en cada variable fictícia només s’inclouen dos genotips cada vegada: l’homozigot per a l’al·lel més favorable davant cada un dels altres dos possibles genotips (*taules 16-24*). S’anomenen *variables fictícies* perquè només tenen sentit quan s’introdueixen de forma conjunta al model. Quan la variable independent “genotip” s’ha dicotomitat en dues variables fictícies i una d’elles és estadísticament significativa i l’altra no ho és s’ha fet una nova regressió lineal múltiple agrupant genotips per tal de fer més comprensible l’efecte de l’al·lel de risc. Els resultats d’aquestes darreres regressions es comenten al text però no es mostren en forma de taula.

L’estudi dels polimorfismes de l’*ACE2* s’ha realitzat separant els dos sexes, ja que el gen es troba contingut al cromosoma X i per tant la dotació al·lèlica entre homes i dones és diferent.

Les regressions mostrades a continuació s’han obtingut incloent totes les variables de control considerades prèviament (consulteu l’apartat 4.2.2.1), però a les taules només es mostren aquelles que han presentat un coeficient de regressió estadísticament significatiu, amb l’únic objectiu de simplificar-ne la visualització. Els guions signifiquen variables no significatives.

### **Polimorfisme I/D del gen ACE1**

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>ACE1 (DD vs II)</b>	-1,9 (-4,5 a 0,7)	0,157	-0,6 (-1,5 a 0,3)	0,178
<b>ACE1 (ID vs II)</b>	-2,5 (-5,0 a 0,1)	0,061	-0,9 (-1,7 a -0,0)	0,041
Sexe	-	-	0,8 (0,1 a 1,5)	0,025
MDRD basal	0,1 (0,01 a 0,13)	0,028	-0,04 (-0,06 a -0,02)	2,6x10 <sup>-4</sup>
Hematòcrit (%)	0,3 (0,09 a 0,46)	0,004	0,12 (0,06 a 0,18)	1,2x10 <sup>-4</sup>
Excreció de proteïna AUC	-3,2 (-3,7 a -2,7)	4,5x10 <sup>-23</sup>	-1,2 (-1,4 a -1,1)	5,7x10 <sup>-34</sup>
Tensió arterial sistòlica AUC	-0,1 (-0,2 a -0,04)	0,001	-	-

**Taula 16.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren la contribució del polimorfisme I/D del gen ACE1 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de l’MDRD.

Si agrupem genotips, els pacients portadors de l'al·lel D respecte els que tenen genotip II, presenten una diferència anual relativa de filtració glomerular de -2,2 unitats de percentatge ( $p=0,072$ ), que representa un pendent anual de l'MDRD de -0,7 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> ( $p=0,063$ ). Aquest efecte no arriba a ser estadísticament significatiu (dades no mostrades).

#### **Lectura de les regressions lineals múltiples:**

**Diferència anual relativa de l'MDRD:** Si prenem com a exemple la taula 16, els pacients amb genotip DD presenten una progressió més ràpida de la nefropatia que els individus II, ja que la disminució anual relativa de l'MDRD és més acusada pels individus DD: exactament -1,9 unitats de percentatge més. El canvi mitjà en la diferència relativa anual de l'MDRD és entre -4,5 i 0,7 unitats de percentatge superior en els pacients DD en comparació amb els pacients II. En aquest cas, però, aquest efecte no és estadísticament significatiu.

**Pendent anual de l'MDRD:** Prenent com a exemple la mateixa taula, els pacients amb genotip ID tenen un pendent anual de l'MDRD -0,9 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> més acusat que els individus amb genotip II; i aquest efecte és estadísticament significatiu.

El pendent i la diferència anual relativa de l'MDRD són negatius perquè al llarg dels anys es produeix una pèrdua de velocitat de filtració glomerular. Si l'efecte d'un polimorfisme sobre un altre té signe negatiu, significa que tant el pendent com la diferència anual relativa encara es tornen més negatius, és a dir, la nefropatia té una progressió encara més ràpida.

#### **Polimorfisme p.M235T del gen AGT**

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	$p$	$\beta$ (IC 95%)	$p$
<b>AGT (MM vs TT)</b>	-2,0 (-4,7 a 0,7)	0,147	-0,8 (-1,6 a 0,1)	0,088
<b>AGT (MT vs TT)</b>	-1,7 (-4,2 a 0,9)	0,195	-0,8 (-1,7 a -0,0)	0,046
MDRD basal	0,07 (0,05 a 0,125)	0,034	-0,04 (-0,1 a -0,02)	$2,6 \times 10^{-4}$
Hematòcrit (%)	0,27 (0,08 a 0,46)	0,005	0,12 (0,06 a 0,18)	$1,2 \times 10^{-4}$
Excreció de proteïna AUC	-3,2 (-3,7 a -2,6)	$6,9 \times 10^{-25}$	-1,2 (-1,4 a -1,0)	$1,3 \times 10^{-32}$
Tensió arterial sistòlica AUC	-0,09 (-0,2 a -0,04)	0,001	-	-

**Taula 17.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme p.M235T del gen AGT sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de l'MDRD.

Els pacients portadors de l'al·lel M respecte als que tenen genotip TT, presenten un pendent anual de l'MDRD de -0,8 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> ( $p=0,041$ ), que representa 1,8

unitats de percentatge menys de diferència anual relativa de l'MDRD ( $p=0,138$ ). Aquestes dades no estan mostrades.

### **Polimorfisme g.1166A>C del gen AGTR1**

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	$p$	$\beta$ (IC 95%)	$p$
<b>AGTR1 (CC vs AA)</b>	-2,4 (-6,4 a 1,6)	0,244	-0,8 (-2,1 a 0,5)	0,241
<b>AGTR1 (AC vs AA)</b>	0,1 (-1,8 a 2,1)	0,893	0,04 (-0,6 a 0,7)	0,901
Sexe	-	-	0,7 (0,03 a 1,4)	0,042
MDRD basal	0,07 (0,01 a 0,13)	0,034	-0,04 (-0,1 a -0,02)	$2,5 \times 10^{-4}$
Hematòcrit (%)	0,3 (0,1 a 0,5)	0,004	0,12 (0,06 a 0,19)	$1,1 \times 10^{-4}$
Excreció de proteïna AUC	-3,2 (-3,8 a -2,7)	$3,5 \times 10^{-25}$	-1,2 (-1,4 a -1,1)	$6,9 \times 10^{-33}$
Tensió arterial sistòlica AUC	-0,1 (-0,2 a -0,04)	0,001	-	-

**Taula 18.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme g.1166A>C del gen AGTR1 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de l'MDRD.

### **Polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2**

#### **homes**

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	$p$	$\beta$ (IC 95%)	$p$
<b>A&gt;G ACE2 (A vs G)</b>	-0,9 (-3,0 a 1,1)	0,379	-1,0 (-1,8 a -0,1)	0,021
MDRD basal	-	-	-0,04 (-0,1 a -0,02)	0,001
Hematòcrit (%)	0,3 (0,2 a 0,5)	0,004	0,14 (0,07 a 0,22)	0,0002
Excreció de proteïna AUC	-3,3 (-4,0 a -2,7)	$2,9 \times 10^{-18}$	-1,1 (-1,3 a -0,8)	$1,6 \times 10^{-13}$
Tensió arterial sistòlica AUC	-0,06 (-0,1 a -0,00)	0,048	-	-

**Taula 19.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 en homes sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de l'MDRD.



**dones**

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	$p$	$\beta$ (IC 95%)	$p$
<b>A&gt;G ACE2 (AA vs GG)</b>	-0,7 (-7,5 a 6,2)	0,851	-0,3 (-2,1 a 1,5)	0,744
<b>A&gt;G ACE2 (AG vs GG)</b>	-0,9 (-5,3 a 3,5)	0,689	-0,05 (-1,2 a 1,1)	0,926
MDRD basal	0,2 (0,02 a 0,29)	0,026	-	-
Excreció de proteïna AUC	-3,6 (-4,6 a -2,6)	$4,7 \times 10^{-10}$	-1,5 (-1,8 a -1,3)	$1,4 \times 10^{-19}$
Tensió arterial sistòlica AUC	-0,13 (-0,3 a -0,01)	0,038	-	-

**Taula 20.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 en dones sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de l'MDRD.

**Polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2****homes**

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	$p$	$\beta$ (IC 95%)	$p$
<b>C&gt;T ACE2 (C vs T)</b>	0,5 (-2,1 a 3,0)	0,712	-0,01 (-1,0 a 1,0)	0,979
MDRD basal	-	-	-0,04 (-0,1 a -0,02)	0,001
Hematòcrit (%)	0,3 (0,1 a 0,5)	0,001	0,14 (0,07 a 0,21)	0,0002
Excreció de proteïna AUC	-3,2 (-3,8 a -2,5)	$3,0 \times 10^{-17}$	-1,0 (-1,3 a -0,8)	$6,4 \times 10^{-13}$
Tensió arterial sistòlica AUC	-0,07 (-0,1 a -0,00)	0,038	-	-

**Taula 21.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2 en homes sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de l'MDRD.

**dones**

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	$p$	$\beta$ (IC 95%)	$p$
<b>C&gt;T ACE2 (CC vs TT)</b>	-3,5 (-11,9 a 4,9)	0,409	-0,1 (-2,3 a 2,0)	0,910
<b>C&gt;T ACE2 (CT vs TT)</b>	-2,5 (-11,0 a 6,0)	0,565	-0,5 (-2,7 a 1,7)	0,639
MDRD basal	0,17 (0,03 a 0,30)	0,018	-	-
Excreció de proteïna AUC	-3,5 (-4,5 a -2,5)	$4,8 \times 10^{-10}$	-1,5 (-1,8 a -1,3)	$7,7 \times 10^{-20}$
Tensió arterial sistòlica AUC	-0,13 (-0,26 a -0,01)	0,034	-	-

**Taula 22.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2 en dones sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de l'MDRD.

### **Polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2**

#### **homes**

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	$p$	$\beta$ (IC 95%)	$p$
<b>G&gt;C ACE2 (G vs C)</b>	-1,2 (-3,3 a 0,9)	0,270	-0,9 (-1,7 a -0,1)	0,027
MDRD basal	-	-	-0,04 (-0,1 a -0,01)	0,004
Hematòcrit (%)	0,3 (0,1 a 0,5)	0,001	0,13 (0,06 a 0,20)	0,001
Excreció de proteïna AUC	-3,1 (-3,8 a -2,5)	$1,6 \times 10^{-16}$	-0,9 (-1,2 a -0,7)	$2,2 \times 10^{-11}$
Tensió arterial sistòlica AUC	-0,07 (-0,13 a -0,01)	0,033	-	-

**Taula 23.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 en homes sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de l'MDRD.

#### **dones**

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	$p$	$\beta$ (IC 95%)	$p$
<b>G&gt;C ACE2 (GG vs CC)</b>	-1,1 (-5,6 a 3,4)	0,633	-0,2 (-1,4 a 0,9)	0,697
<b>G&gt;C ACE2 (GC vs CC)</b>	-2,1 (-8,3 a 4,1)	0,497	-0,7 (-2,3 a 0,9)	0,370
MDRD basal	0,16 (0,02 a 0,29)	0,021	-	-
Excreció de proteïna AUC	-3,6 (-4,6 a -2,5)	$3,8 \times 10^{-10}$	-1,5 (-1,3 a -0,8)	$6,0 \times 10^{-20}$
Tensió arterial sistòlica AUC	-0,14 (-0,3 a -0,01)	0,031	-	-

**Taula 24.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 en dones sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de l'MDRD.

Tal com mostren les *taules 19 i 23*, els polimorfismes c.186+2053G>A i c.1542-361C>G del gen ACE2 tenen un efecte significatiu –que s'observa únicament en els homes– sobre la progressió de la nefropatia estimada com a pendent de MDRD. Per exemple, pel que fa al polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2, els homes amb al·lel G tenen de mitjana un pendent de l'MDRD -0,9 unitats per sota del dels homes amb al·lel C ( $p=0,027$ ).

El polimorfisme p.M235T de l'AGT també presenta efectes estadísticament significatius sobre el pendent de l'MDRD.

#### **4.2.2.3 Regressions combinant polimorfismes**

Seguint els criteris de combinació descrits a l'apartat 3.3, hem procedit a l'estudi de l'efecte conjunt que tenen els polimorfismes sobre la progressió de la nefropatia.

La nova variable **nº d'al·lels de risc** s'ha formulat per totes les possibles combinacions entre els polimorfismes que presentessin una  $p$  inferior a 0,20 a les regressions individuals.

Pel que fa al pendent de l'MDRD, podem combinar quatre polimorfismes. Els seus possibles "al·lels de risc" són: **D** del polimorfisme I/D del gen *ACE1*, **M** del polimorfisme p.M235T del gen *AGT*, **A** del polimorfisme c.186+2053G>A i **G** del polimorfisme c.1542-361C>G del gen *ACE2*. En un sentit estricte les combinacions que incloguin els polimorfismes de l'*ACE2* s'haurien de fer únicament amb homes, però per no disminuir la  $n$ , les combinacions s'han provat també amb homes i dones junts.

La **combinació de dos polimorfismes** que millor estima l'efecte sobre la progressió de la nefropatia és la formada per l'al·lel **M** del polimorfisme p.M235T i **A** del c.186+2053G>A de l'*ACE2*, on per cada al·lel de risc la disminució anual de la velocitat de filtració glomerular és de -0,31 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> més ( $p=0,025$ ). Això significa que un pacient amb els quatre al·lels de risc té una disminució anual de l'MDRD de -1,2 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (-0,31x4) més respecte un pacient que no tingui cap al·lel de risc (*taula 25*). En els homes, aquesta combinació encara és estadísticament més significativa: per cada al·lel de risc de més, el pendent anual disminueix -0,4 (-0,8 a -0,1) mL/min/1,73 m<sup>2</sup> ( $p=0,006$ ).

La **combinació de tres polimorfismes** que millor estima l'efecte sobre la progressió de la nefropatia és la formada per *ACE1*, *AGT* i c.186+2053G>A de l'*ACE2*, on per cada al·lel de risc, el pendent de la pèrdua de velocitat de filtració glomerular és -0,26 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> més acusat ( $p=0,023$ ). Això significa que un pacient amb els sis al·lels de risc té una disminució anual de l'MDRD de -1,6 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (-0,26x6) més respecte un pacient que no tingui cap al·lel de risc (*taula 26*). Si exclouem les dones de l'anàlisi, la combinació de tres polimorfismes que millor estima la progressió de la nefropatia en els homes coincideix amb la de tota la població: és la formada per *ACE1*, *AGT* i c.186+2053G>A de l'*ACE2*, on per cada al·lel de risc, el pendent anual disminueix -0,36 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> ( $p=0,010$ ). Això significa que un home amb els sis al·lels de risc té una disminució anual de l'MDRD de -2,2 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (-0,36x6) més respecte un altre home que no tingui cap al·lel de risc (*taula 27*).

Finalment, la **combinació de quatre polimorfismes** –**D** (*ACE1*), **M** (*AGT*), **A** (c.186+2053G>A) i **G** (c.1542-361C>G)– no aporta cap millora al model de tres polimorfismes. L'efecte màxim que explica la regressió és de -1,5 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (dades no mostrades,  $p=0,012$ ) i és inferior a l'efecte descrit en combinacions anteriors.

- Combinació de 2 polimorfismes: M (p.M235T) + A (c.186+2053G>A)

Variables de la regressió	pendent de MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
nº d'al·lels de risc (M+A)	-0,31 (-0,57 a -0,04)	0,025
Sexe	0,7 (0,0 a 1,4)	0,044
MDRD basal	-0,04 (-0,06 a -0,02)	2,4x10 <sup>-4</sup>
Hematòcrit (%)	0,14 (0,07 a 0,20)	3,8x10 <sup>-5</sup>
Excreció de proteïna	-1,3 (-1,5 a -1,1)	1,5x10 <sup>-33</sup>

**Taula 25.** Coeficients de regressió  $\beta$ , intervals de confiança del 95% i significació estadística del nº d'al·lels de risc -M (p.M235T) i A (c.186+2053G>A)- i de les variables de control significatives que mesuren l'efecte del nº d'al·lels de risc sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant el pendent anual de l'MDRD.

- Combinació de 3 polimorfismes: D (I/D) + M (p.M235T) + A (c.186+2053G>A)

Variables de la regressió	pendent de MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
nº d'al·lels de risc(D+M+A)	-0,26 (-0,48 a -0,04)	0,023
MDRD basal	-0,04 (-0,06 a -0,02)	2,5x10 <sup>-4</sup>
Hematòcrit (%)	0,14 (0,07 a 0,20)	2,9x10 <sup>-5</sup>
Excreció de proteïna	-1,3 (-1,5 a -1,1)	1,3x10 <sup>-33</sup>

**Taula 26.** Coeficients de regressió  $\beta$ , intervals de confiança del 95% i significació estadística del nº d'al·lels de risc -D (ACE1), M (AGT) i A (c.186+2053G>A)- i de les variables de control significatives que mesuren l'efecte del nº d'al·lels de risc sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant el pendent anual de l'MDRD.

només homes

Variables de la regressió	pendent de MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
nº d'al·lels de risc(D+M+A)	-0,36 (-0,62 a -0,09)	0,010
MDRD basal	-0,04 (-0,06 a -0,01)	0,001
Hematòcrit (%)	0,14 (0,09 a 0,21)	0,001
Excreció de proteïna	-1,1 (-1,3 a -0,8)	2,1x10 <sup>-13</sup>

**Taula 27.** Coeficients de regressió  $\beta$ , intervals de confiança del 95% i significació estadística del nº d'al·lels de risc -D (ACE1), M (AGT) i A (c.186+2053G>A)- i de les variables de control significatives que mesuren l'efecte del nº d'al·lels de risc sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant el pendent de l'MDRD. S'han inclòs els pacients **homes** (n=204).

Pel que fa a la diferència relativa anual de l'MDRD només podem combinar dos dels polimorfismes anteriors: **D** del polimorfisme I/D i **M** del polimorfisme p.M235T. La seva combinació no té efectes estadísticament significatius sobre la progressió de la nefropatia (dades no mostrades,  $p=0,087$ ).

#### 4.2.2.4 Selecció segons l'MDRD inicial

A continuació hem analitzat si l'MDRD amb el que arriba el pacient a la consulta és determinant en la posterior progressió, i si aquesta informació està relacionada amb la genètica. Per a això, tot i que els models anteriors ja estaven controlats per l'MDRD basal, hem classificat els pacients en dos grups per tal de fer evident aquest matís: els que presentaven un MDRD  $\geq 60$  mL/min/m<sup>2</sup> a la primera visita a l'especialista i els que ja no tenien la velocitat de filtració glomerular conservada. Per simplicitat, les dades relatives a aquest darrer grup (n= 197) no es presenten en aquest treball. En cap cas s'ha obtingut un efecte estadísticament significatiu.

Pel que fa a les dades relatives al grup amb MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/m<sup>2</sup> (n=123) s'aprecia un efecte genètic més clar sobre la progressió de la nefropatia que no pas amb el grup sencer.

Quant als polimorfismes de l'ACE2, només hi ha 37 dones amb MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>. Aquest nombre és insuficient per dur a terme regressions lineals múltiples perquè podria estar produint distorsions en els coeficients de regressió: només hi ha 5 dones amb genotip AA pel polimorfisme c.186+2053G>A, 2 dones amb genotip TT pel polimorfisme c.439+4C>T i 7 dones amb genotip GG pel polimorfisme c.1542-361C>G. Per això s'han agrupat les portadores dels al·lels A, T i G respectivament.

A continuació es presenten les regressions lineals múltiples per aquells polimorfismes que tenen una significació estadística  $<0,20$ , que són tots excepte els polimorfismes g.1166A>C del gen *AGTR1* i c.439+4C>T de l'ACE2 (taules 28-33).

#### Polimorfisme I/D del gen ACE1

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	p	$\beta$ (IC 95%)	p
ACE1 (DD vs II)	-2,9 (-5,8 a 0,05)	0,058	-0,8 (-2,2 a 0,5)	0,222
ACE1 (ID vs II)	-3,7 (-6,6 a -0,8)	0,013	-1,2 (-2,5 a 0,1)	0,081
Sexe	-	-	1,1 (0,0 a 2,3)	0,05
MDRD basal	-	-	-0,05 (-0,09 a -0,01)	0,03
Hematòcrit (%)	0,32 (0,07 a 0,57)	0,013	0,15 (0,04 a 0,27)	0,009
Excreció de proteïna AUC	-4,4 (-5,3 a -3,6)	$5,0 \times 10^{-12}$	-1,8 (-2,2 a -1,4)	$7,7 \times 10^{-15}$
Hemoglobina A1c basal	-	-	-0,4 (-0,7 a -0,1)	0,012

**Taula 28.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme I/D del gen ACE1 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de l'MDRD només en els pacients amb MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (n=123).

Si fem agrupació de genotips, els pacients portadors de l'al·lel D presenten una diferència anual relativa de filtració glomerular de -3,3 (-0,3 a -6,0) unitats de percentatge ( $p=0,017$ ) respecte als que tenen genotip II.

### Polimorfisme p.M235T del gen AGT

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	$p$	$\beta$ (IC 95%)	$p$
<b>AGT (MM vs TT)</b>	-3,0 (-6,0 a -0,1)	0,041	-1,5 (-2,9 a -0,2)	0,023
<b>AGT (MT vs TT)</b>	-4,1 (-6,8 a -1,4)	0,004	-1,8 (-3,0 a -0,5)	0,005
MDRD basal	-	-	-0,05 (-0,1 a -0,01)	0,017
Hematòcrit (%)	0,32 (0,07 a 0,57)	0,012	0,15 (0,04 a 0,27)	0,008
Excreció de proteïna AUC	-4,4 (-5,2 a -3,5)	$1,7 \times 10^{-17}$	-1,8 (-2,1 a -1,4)	$8,3 \times 10^{-15}$
Hemoglobina A1c basal	-	-	-0,3 (-0,6 a -0,05)	0,020

**Taula 29.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme p.M235T del gen AGT sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de l'MDRD només en els pacients amb MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (n=123).

Els pacients portadors de l'al·lel M respecte als que tenen genotip TT, presenten un decrement anual de l'MDRD de -1,7 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> ( $p=0,005$ ), que representa 3,7 unitats de percentatge menys de diferència anual relativa de l'MDRD ( $p=0,005$ ).

### Polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2

#### homes

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	$p$	$\beta$ (IC 95%)	$p$
<b>A&gt;G ACE2 (A vs G)</b>	-3,4 (-6,2 a -0,6)	0,017	-2,3 (-3,5 a -1,0)	0,001
Hematòcrit (%)	-	-	0,13 (0,00 a 0,26)	0,049
Excreció de proteïna AUC	-3,7 (-4,7 a -2,7)	$1,3 \times 10^{-10}$	-1,6 (-2,1 a -1,2)	$4,5 \times 10^{-10}$
Tensió arterial sistòlica AUC	-	-	-0,4 (-0,8 a -0,04)	0,03

**Taula 30.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 en homes sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de l'MDRD només en homes amb MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (n=86).

**dones**

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	$p$	$\beta$ (IC 95%)	$p$
<b>A&gt;G ACE2 (A vs GG)</b>	-0,8 (-4,9 a 3,3)	0,687	-0,1 (-1,2 a 1,0)	0,846
MDRD basal	0,2 (0,02 a -0,3)	0,023	-	-
Excreció de proteïna AUC	-3,6 (-4,6 a -2,6)	$3,7 \times 10^{-10}$	-1,5 (-1,8 a -1,3)	$8,3 \times 10^{-20}$

**Taula 31.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 en dones sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de l'MDRD només en dones amb MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (n=37).

**Polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2****homes**

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	$p$	$\beta$ (IC 95%)	$p$
<b>G&gt;C ACE2 (G vs C)</b>	-2,6 (-5,4 a 0,2)	0,064	-1,5 (-2,8 a -0,2)	0,020
Excreció de proteïna AUC	-3,7 (-4,8 a -2,6)	$3,3 \times 10^{-9}$	-1,4 (-1,9 a -0,9)	$2,4 \times 10^{-7}$

**Taula 32.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 en homes sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de l'MDRD només en homes amb MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (n=86).

**dones**

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	$p$	$\beta$ (IC 95%)	$p$
<b>G&gt;C ACE2 (GG vs C)</b>	-1,6 (-7,4 a 4,2)	0,582	-0,6 (-2,1 a 0,9)	0,415
MDRD basal	0,2 (0,02 a 0,3)	0,022	-	-
Excreció de proteïna AUC	-3,6 (-4,6 a -2,6)	$3,1 \times 10^{-10}$	-1,5 (-1,8 a -1,3)	$3,9 \times 10^{-20}$
Tensió arterial sistòlica AUC	-0,1 (-0,3 a -0,01)	0,034	-	-

**Taula 33.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 en dones sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de l'MDRD només en dones amb MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (n=37).

A continuació, i seguint l'esquema presentat en els apartats anteriors, classifiquem els al·lells en "al·lells de risc" de progressió ràpida de la nefropatia, segons el criteri de  $p < 0,2$  ja explicat anteriorment.

Els al·lells de risc són: **D** del polimorfisme I/D del gen ACE1, **M** del polimorfisme p.M235T del gen AGT, **A** del polimorfisme c.186+2053G>A i **G** del polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 per a tots dos criteris d'avaluació de la progressió de la

malaltia. Els dos polimorfismes situats al cromosoma X han resultat significatius únicament pels homes.

Es procedeix a la combinació d'aquests 4 polimorfismes:

La **combinació de dos polimorfismes** que millor estima l'efecte sobre la progressió de la nefropatia és la formada per *ACE1* i *AGT* en la diferència relativa anual de l'MDRD, i *AGT* i c.186+2053G>A pel pendent de l'MDRD (*taula 34*).

Per cada al·lel de risc **D** de l'*ACE1* i **M** de l'*AGT* de més, la diferència relativa anual de l'MDRD disminueix -1,3 unitats de percentatge ( $p=0,017$ ). Això significa que un pacient amb els quatre al·lells de risc té una disminució relativa anual de l'MDRD 5,2 unitats de percentatge per sota de la d'un pacient que no tingui cap al·lel de risc.

Pel que fa al pendent de l'MDRD, per cada al·lel de risc **M** de l'*AGT* i **A** del c.186+2053G>A, la disminució anual de la filtració glomerular és 0,65 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> més acusada ( $p=0,001$ ). Això suposa que un pacient amb els quatre al·lells de risc respecte un altre que no en tingui cap, té una disminució anual addicional de l'MDRD de -2,6 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>.

La **combinació de tres polimorfismes** que millor estima l'efecte sobre la progressió de la nefropatia és la formada per *ACE1*, *AGT* i c.186+2053G>A de l'*ACE2* (*taula 35*).

Per cada al·lel de risc **D** de l'*ACE1*, **M** de l'*AGT* i **A** del c.186+2053G>A de més, la diferència relativa anual de l'MDRD disminueix -1,1 unitats de percentatge ( $p=0,005$ ). Això significa que un pacient amb els sis al·lells de risc té una diferència relativa de l'MDRD 6,6 unitats de percentatge per sota de la d'un pacient que no tingui cap al·lel de risc.

Pel que fa al pendent, per cada al·lel de risc la velocitat de filtració glomerular anual disminueix -0,6 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> més ( $p=5,2 \times 10^{-4}$ ). Això significa que un pacient amb els sis al·lells de risc té una disminució anual de l'MDRD de 3,6 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> més respecte un pacient que no tingui cap al·lel de risc.

Com passava a l'apartat 4.1.3.3, si només es seleccionen els homes, s'obtenen efectes estadísticament més significatius per a les combinacions que inclouen polimorfismes de l'*ACE2*. La millor combinació de tres polimorfismes en els homes és la mateixa que per tota la població (*taula 36*). Pel que fa a la diferència anual relativa de l'MDRD, per cada al·lel de risc **D** de l'*ACE1*, **M** de l'*AGT* i **A** del c.186+2053G>A de més, disminueix -1,6 unitats de percentatge ( $p=0,002$ ). Això significa que un home amb els sis al·lells de risc té una diferència relativa anual de l'MDRD 9,6 unitats de percentatge per sota de la d'un home que no tingui cap al·lel de risc. Quan s'avalua la



progressió de la nefropatia mitjançant el pendent de l'MDRD només en homes s'obté que per cada al·lel de risc, la disminució anual de la velocitat de filtració glomerular és de  $-0,86 \text{ mL/min/1,73 m}^2$  més ( $p=2,8 \times 10^{-4}$ ).

Finalment, la **combinació de quatre polimorfismes –D (ACE1), M (AGT), A (c.186+2053G>A) i G (c.1542-361C>G)–** no millora el model de tres polimorfismes. L'efecte màxim que explica la regressió és de  $-2,8 \text{ mL/min/1,73 m}^2$  (dades no mostrades,  $p=0,003$ ), que en unitats de percentatge equivaldria a  $-4,8$  ( $p=0,020$ ). Aquests efectes són inferiors als mostrats en combinacions anteriors.

#### - Combinació de 2 polimorfismes:

Diferència anual relativa de MDRD: D (I/D) + M (p.M235T)

Pendent de MDRD: M (p.M235T) + A (c.186+2053G>A)

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	$p$	$\beta$ (IC 95%)	$p$
<b>Nº d'al·lels de risc</b>	<b>(D + M):</b> -1,3 (-2,4 a -0,2)	0,017	<b>(M + A):</b> -0,65 (-1,0 a -0,26)	0,001
Sexe	-	-	0,8 (0,1 a 1,5)	0,025
MDRD basal	-	-	-0,05 (-0,09 a -0,01)	0,020
Hematòcrit (%)	0,3 (0,06 a 0,6)	0,015	0,14 (0,02 a 0,25)	0,018
Excreció de proteïna AUC	-4,4 (-5,2 a -3,5)	$2,5 \times 10^{-17}$	-1,8 (-2,2 a -1,4)	$2,5 \times 10^{-15}$
Hemoglobina A1c basal	-	-	-0,4 (-0,6 a -0,1)	0,014

**Taula 34.** Coeficients de regressió  $\beta$ , intervals de confiança del 95% i significació estadística del nº d'al·lels de risc –D (I/D) i M (p.M235T)– i –M (p.M235T) i A (c.186+2053G>A)– de les variables de control significatives que mesuren l'efecte del nº d'al·lels de risc sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent anual de l'MDRD, respectivament. Només s'han inclòs els pacients amb l'MDRD basal  $\geq 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$  ( $n=123$ ).

#### - Combinació de 3 polimorfismes: D (I/D) + M (p.M235T) + A (c.186+2053G>A)

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	$p$	$\beta$ (IC 95%)	$p$
<b>Nº d'al·lels de risc (D+M+A)</b>	-1,1 (-1,9 a -0,3)	0,005	-0,64 (-1,0 a -0,29)	$5,2 \times 10^{-4}$
MDRD basal	-	-	-0,05 (-0,09 a -0,01)	0,027
Hematòcrit (%)	0,3 (0,07 a 0,6)	0,011	0,15 (0,04 a 0,26)	0,010
Excreció de proteïna AUC	-4,3 (-5,2 a -3,5)	$1,8 \times 10^{-17}$	-1,8 (-2,1 a -1,4)	$3,2 \times 10^{-15}$
Hemoglobina A1c basal	-	-	-0,4 (-0,7 a -0,1)	0,009

**Taula 35.** Coeficients de regressió  $\beta$ , intervals de confiança del 95% i significació estadística del nº d'al·lels de risc –D (I/D), M (p.M235T) i A (c.186+2053G>A)– de les variables de control significatives que mesuren l'efecte del nº d'al·lels de risc sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent anual de l'MDRD. Només s'han inclòs els pacients amb l'MDRD basal  $\geq 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$  ( $n=123$ ).

només homes:

Variables de la regressió	Diferència anual relativa MDRD		Pendent MDRD	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>Nº d'al·lels de risc (D+M+G)</b>	-1,6 (-2,5 a -0,6)	0,002	-0,86 (-1,3 a -0,41)	$2,8 \times 10^{-4}$
Hematòcrit (%)	0,3 (0,01 a 0,5)	0,043	0,15 (0,03 a 0,28)	0,019
Excreció de proteïna AUC	-3,6 (-4,5 a -2,6)	$2,0 \times 10^{-10}$	-1,6 (-2,0 a -1,1)	$1,4 \times 10^{-9}$
Hemoglobina A1c basal	-	-	-0,4 (-0,8 a -0,02)	0,038

**Taula 36.** Coeficients de regressió  $\beta$ , intervals de confiança del 95% i significació estadística del nº d'al·lels de risc –**D (I/D)**, **M (p.M235T)** i **A (c.186+2053G>A)**– de les variables de control significatives que mesuren l'efecte del nº d'al·lels de risc sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent anual de l'MDRD. Només s'han inclòs els **homes** amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (n=86).

## 4.2.3 Anàlisi de la supervivència: regressions de Cox

### 4.2.3.1 Models univariants

Seguint el mateix esquema exposat a la regressió lineal múltiple, en primer lloc es realitzen models de regressió de Cox univariants per tal de decidir quines variables de control s'introdueixen als models definitius. S'han escollit aquelles variables per les quals l'interval de confiança de la taxa de risc del model univariant ( $e^{\beta}$ ) no inclou l'1, és a dir, que sigui estadísticament significatiu. Aquest procés s'ha realitzat per les 3 variables en consideració: el risc de canviar d'estadi d'insuficiència renal crònica, el risc de doblar la concentració de creatinini al plasma i el risc de disminuir a la meitat l'MDRD (*taula 37*).

Tal com ja s'ha plantejat a l'apartat anterior (4.2.2.1), les variables edat, sexe, MDRD basal i concentració de creatinini basal s'introduiran al model de regressió definitiu independentment dels resultats del model univariant.

Magnitud	$e^{\beta}$ (IC 95%) canviar d'estadi	$e^{\beta}$ (IC 95%) doblar creatinini	$e^{\beta}$ (IC 95%) disminuir a la meitat MDRD
IMC	1,0 (0,98 – 1,1)	1,0 (0,95 – 1,05)	1,0 (0,95 - 1,04)
Srm—Albúmina	0,91 (0,86 – 0,95)*	0,91 (0,88 – 0,94)*	0,91 (0,88 – 0,94)*
Hematòcrit (%)	0,91 (0,88 – 0,95)*	0,91 (0,88 – 0,94)*	0,92 (0,89 – 0,95)*
Srm—Triglicèrid	1,1 (0,95 – 1,3)	0,97 (0,85 – 1,11)	1,0 (0,87 – 1,11)
Tabaquisme	1,0 (0,59 – 1,70)	1,06 (0,70 – 1,61)	0,93 (0,61 – 1,41)
Tractament	0,63 (0,34 – 1,15)	0,93 (0,54 – 1,60)	0,92 (0,54 – 1,56)

**Taula 37.** Coeficients de regressió de Cox ( $e^{\beta}$ ) i intervals de confiança del 95% (IC 95%) de les possibles variables de control que es mesuren a la primera visita en els models de regressió univariants per cada una de les 3 variables dependents.

\*Variables que compleixen els criteris d'inclusió al model definitiu.

Pel que fa a les variables de control amb seguiment anual, s'ha plantejat introduir-les al model amb un dels següents formats: mesura basal, mitjana de totes les mesures recollides o bé integral de la corba que conformen tots els punts –AUC–. D'aquests tres, s'ha escollit aquell criteri que estima la taxa de risc amb més significació estadística (*taula 38*).

Magnitud	<i>p</i> canviar d'estadi	<i>p</i> doblar creatinini	<i>p</i> disminuir a la meitat MDRD
Srm—Colesterol basal	0,276	0,621	0,286
Srm—Colesterol mitjana	0,014	0,048	0,069
Srm—Colesterol AUC	0,007 *	0,043 *	0,048 *
Pac(Uri)—Excreció de proteïna basal	$1,7 \times 10^{-7}$	$8,7 \times 10^{-12}$	$5,7 \times 10^{-12}$
Pac(Uri)—Excreció de proteïna mitjana	$1,2 \times 10^{-17}$	$4,2 \times 10^{-32}$	$1,9 \times 10^{-29}$
Pac(Uri)—Excreció de proteïna AUC	$1,2 \times 10^{-18}$ *	$1,0 \times 10^{-33}$ *	$6,5 \times 10^{-31}$ *
Hb(San)—Hemoglobina A1c basal	0,015 *	0,053	0,063
Hb(San)—Hemoglobina A1c mitjana	0,036	0,980	0,614
Hb(San)—Hemoglobina A1c AUC	0,058	0,724	0,963
Tensió arterial sistòlica basal	0,027	$4,7 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-5}$
Tensió arterial sistòlica mitjana	$1,2 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-9}$ *	$1,0 \times 10^{-9}$
Tensió arterial sistòlica AUC	$6,0 \times 10^{-6}$ *	$1,2 \times 10^{-9}$	$5,2 \times 10^{-10}$ *
Tensió arterial diastòlica basal	0,311	0,201	0,567
Tensió arterial diastòlica mitjana	0,618	0,990	0,935
Tensió arterial diastòlica AUC	0,748	0,783	0,855

**Taula 38.** Significació estadística (*p*) de les variables de control amb seguiment anual en els models de regressió de Cox univariants per cada una de les 3 variables dependents.

\*Variables que compleixen els criteris d'inclusió al model definitiu.

Pel que fa al criteri “**risc de canviar d'estadi d'insuficiència renal crònica**”, les variables de control que s'inclouran al model de regressió definitiu seran: edat; sexe; MDRD basal; Srm—Albúmina; c.massa; San—Eritròcits; fr.vol.(hematòcrit); àrea sota la corba de Srm—Colesterol; c.subst., Pac(Uri)—Excreció de proteïna; cabal massa(24h) i tensió arterial sistòlica i la mesura basal de Hb(San)—Hemoglobina A1c; fr.subst.

Respecte al criteri “**risc de doblar la concentració de creatinini del plasma**”, les variables de control seran: edat; sexe; Srm—Creatinini; c.massa basal; Srm—Albúmina; c.massa; San—Eritròcits; fr.vol.(hematòcrit); àrea sota la corba de Srm—Colesterol; c.subst. i de Pac(Uri)—Excreció de proteïna; cabal massa(24h) i mitjana de la tensió arterial sistòlica.

I finalment, pel que fa al criteri “**risc de disminuir a la meitat l'MDRD**”, les variables de control seran: edat; sexe; MDRD basal; Srm—Albúmina; c.massa; San—Eritròcits; fr.vol.(hematòcrit); àrea sota la corba de Srm—Colesterol; c.subst., Pac(Uri)—Excreció de proteïna; cabal massa(24h) i tensió arterial sistòlica.

#### 4.2.3.2 Regressions independents per cada polimorfisme

A continuació es poden consultar els resultats de les regressions individuals per a cada polimorfisme estudiat (taules 39-47). Les regressions s'han realitzat amb totes les variables de control escollides a l'apartat anterior, encara que a les taules només s'han transcrit les que tenen una taxa de risc estadísticament significativa. L'estudi de la supervivència prenent com a variable dependent el temps que transcorre fins a doblar la concentració de creatinini en el plasma es pot consultar a l'annex C.

##### Polimorfisme I/D del gen ACE1

Variables de la regressió	canvi d'estadi		½ MDRD	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
<b>ACE1 (DD vs II)</b>	1,9 (0,9 a 4,3)	0,104	2,1 (1,1 a 3,9)	0,025
<b>ACE1 (ID vs II)</b>	1,6 (0,8 a 3,4)	0,223	2,2 (1,2 a 4,0)	0,014
Sexe	0,5 (0,3 a 0,8)	0,009	0,5 (0,3 a 0,8)	0,002
MDRD basal	-	-	0,98 (0,97 a 0,99)	0,002
Hematòcrit (%)	0,91 (0,87 a 0,95)	0,0001	0,95 (0,91 a 0,99)	0,009
Srm—Albúmina	-	-	0,95 (0,91 a 0,99)	0,028
Excreció de proteïna AUC	1,4 (1,2 a 1,5)	1,4x10 <sup>-11</sup>	1,3 (1,2 a 1,4)	4,6x10 <sup>-18</sup>
Tensió arterial sistòlica AUC	1,02 (1,01 a 1,04)	0,005	1,03 (1,02 a 1,04)	7,7x10 <sup>-7</sup>

**Taula 39.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme I/D del gen ACE1 sobre el risc que un pacient canviï d'estadi d'insuficiència renal (canvi d'estadi) i el risc que un pacient disminueixi a la meitat l'MDRD (½ MDRD).

##### Polimorfisme p.M235T del gen AGT

Variables de la regressió	canvi d'estadi		½ MDRD	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
<b>AGT (MM vs TT)</b>	1,3 (0,6 a 2,8)	0,438	1,6 (0,8 a 3,0)	0,154
<b>AGT (MT vs TT)</b>	1,4 (0,7 a 2,9)	0,391	1,4 (0,8 a 2,6)	0,269
Sexe	-	-	0,51 (0,33 a 0,79)	0,003
MDRD basal	-	-	0,98 (0,97 a 0,99)	0,004
Hematòcrit (%)	0,93 (0,89 a 0,98)	0,003	0,95 (0,91 a 0,99)	0,006
Excreció de proteïna AUC	1,3 (1,2 a 1,4)	1,4x10 <sup>-10</sup>	1,3 (1,2 a 1,4)	4,2x10 <sup>-16</sup>
Tensió arterial sistòlica AUC	1,02 (1,00 a 1,04)	0,017	1,03 (1,02 a 1,04)	2,2x10 <sup>-5</sup>

**Taula 40.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme p.M235T del gen AGT sobre el risc que un pacient canviï d'estadi d'insuficiència renal (canvi d'estadi) i el risc que un pacient disminueixi a la meitat l'MDRD (½ MDRD).

**Polimorfisme g.1166A>C del gen AGTR1**

Variables de la regressió	canvi d'estadi		½ MDRD	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
<b>AGTR1 (CC vs AA)</b>	0,8 (0,2 a 3,6)	0,810	1,1 (0,5 a 2,5)	0,875
<b>AGTR1 (AC vs AA)</b>	1,1 (0,3 a 4,7)	0,897	1,4 (0,6 a 3,3)	0,394
Sexe	0,44 (0,25 a 0,78)	0,005	0,48 (0,31 a 0,75)	0,001
MDRD basal	-	-	0,98 (0,96 a 0,99)	0,001
Hematòcrit (%)	0,91 (0,87 a 0,96)	0,0002	0,95 (0,91 a 0,99)	0,007
Excreció de proteïna AUC	1,3 (1,2 a 1,5)	3,6x10 <sup>-10</sup>	1,3 (1,2 a 1,4)	2,2x10 <sup>-15</sup>
Tensió arterial sistòlica AUC	1,02 (1,00 a 1,04)	0,020	1,03 (1,02 a 1,04)	1,4x10 <sup>-5</sup>

**Taula 41.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme g.1166A>C del gen AGTR1 sobre el risc que un pacient canviï d'estadi d'insuficiència renal (canvi d'estadi) i el risc que un pacient disminueixi a la meitat l'MDRD (½ MDRD).

**Polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2**

**homes**

Variables de la regressió	canvi d'estadi		½ MDRD	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
<b>A&gt;G ACE2 (A vs G)</b>	1,7 (0,8 a 3,5)	0,158	1,6 (0,9 a 2,8)	0,084
MDRD basal	1,03 (1,01 a 1,06)	0,008	-	-
Hematòcrit (%)	0,88 (0,83 a 0,94)	0,0001	0,92 (0,88 a 0,97)	0,001
Excreció de proteïna AUC	2,3 (1,7 a 2,9)	1,7x10 <sup>-9</sup>	1,54 (1,33 a 1,79)	1,2x10 <sup>-8</sup>

**Taula 42.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 en els homes sobre el risc que un pacient canviï d'estadi d'insuficiència renal (canvi d'estadi) i el risc que un pacient disminueixi a la meitat l'MDRD (½ MDRD).

**dones**

Variables de la regressió	canvi d'estadi		½ MDRD	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
<b>A&gt;G ACE2 (AA vs GG)</b>	1,8 (0,4 a 7,9)	0,421	1,1 (0,3 a 3,8)	0,831
<b>A&gt;G ACE2 (AG vs GG)</b>	0,7 (0,3 a 1,9)	0,712	1,1 (0,5 a 2,4)	0,781
MDRD basal	0,97 (0,95 a 1,00)	0,026	0,97 (0,95 a 1,00)	0,026
Hematòcrit (%)	0,84 (0,74 a 0,95)	0,007	-	-
Excreció de proteïna AUC	1,29 (1,10 a 1,50)	0,002	1,33 (1,20 a 1,47)	7,5x10 <sup>-8</sup>
Tensió arterial sistòlica AUC	-	-	1,03 (1,01 a 1,05)	0,004

**Taula 43.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 en les dones sobre el risc que un pacient canviï d'estadi d'insuficiència renal (canvi d'estadi) i el risc que un pacient disminueixi a la meitat l'MDRD (½ MDRD).

**Polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2****homes**

Variables de la regressió	canvi d'estadi		½ MDRD	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
<b>C&gt;T ACE2 (C vs T)</b>	0,9 (0,4 a 2,0)	0,713	1,3 (0,7 a 2,4)	0,443
Edat primera visita	1,05 (1,01 a 1,09)	0,018	-	-
MDRD basal	1,03 (1,00 a 1,05)	0,032		
Hematòcrit (%)	0,90 (0,85 a 0,96)	0,001	0,93 (0,89 a 0,98)	0,004
Excreció de proteïna AUC	2,1 (1,6 a 2,6)	2,3x10 <sup>-9</sup>	1,5 (1,3 a 1,7)	2,7x10 <sup>-8</sup>

**Taula 44.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2 en els homes sobre el risc que un pacient canviï d'estadi d'insuficiència renal (canvi d'estadi) i el risc que un pacient disminueixi a la meitat l'MDRD (½ MDRD).

**dones**

Variables de la regressió	canvi d'estadi		½ MDRD	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
<b>C&gt;T ACE2 (CC vs TT)</b>	0,9 (0,1 a 7,6)	0,931	2,6 (0,5 a 12,3)	0,240
<b>C&gt;T ACE2 (CT vs TT)</b>	0,8 (0,1 a 6,9)	0,801	2,0 (0,4 a 9,6)	0,383
MDRD basal	-	-	0,97 (0,95 a 0,99)	0,015
Excreció de proteïna AUC	0,84 (0,74 a 0,96)	0,011	1,31 (1,19 a 1,469)	8,8x10 <sup>-8</sup>
Tensió arterial sistòlica AUC	1,29 (1,11 a 1,50)	0,001	1,04 (1,01 a 1,06)	0,003

**Taula 45.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2 en les dones sobre el risc que un pacient canviï d'estadi d'insuficiència renal (canvi d'estadi) i el risc que un pacient disminueixi a la meitat l'MDRD (½ MDRD).

**Polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2****homes**

Variables de la regressió	canvi d'estadi		½ MDRD	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
<b>G&gt;C ACE2 (G vs C)</b>	1,2 (0,6 a 2,6)	0,589	1,5 (0,9 a 2,6)	0,150
Edat primera visita	1,05 (1,01 a 1,09)	0,020		
MDRD basal	1,03 (1,00 a 1,06)	0,024	-	-
Hematòcrit (%)	0,90 (0,85 a 0,96)	0,001	0,93 (0,89 a 0,97)	0,002
Excreció de proteïna AUC	2,06 (1,63 a 2,61)	2,2x10 <sup>-9</sup>	1,49 (1,30 a 1,72)	1,5x10 <sup>-8</sup>

**Taula 46.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 en els homes sobre el risc que un pacient canviï d'estadi d'insuficiència renal (canvi d'estadi) i el risc que un pacient disminueixi a la meitat l'MDRD (½ MDRD).

**dones**

Variables de la regressió	canvi d'estadi		½ MDRD	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
<b>G&gt;C ACE2 (GG vs CC)</b>	3,8 (1,0 a 14,2)	0,047	1,6 (0,5 a 4,5)	0,402
<b>G&gt;C ACE2 (GC vs CC)</b>	0,9 (0,3 a 2,4)	0,755	0,7 (0,3 a 1,6)	0,403
MDRD basal	-	-	0,97 (0,95 a 1,00)	0,020
Hematòcrit (%)	0,83 (0,73 a 0,94)	0,005	-	-
Excreció de proteïna AUC	1,36 (1,16 a 1,58)	9,8x10 <sup>-5</sup>	1,33 (1,21 a 1,47)	1,4x10 <sup>-8</sup>
Tensió arterial sistòlica AUC	-	-	1,03 (1,01 a 1,06)	0,005

**Taula 47.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives dels models que mesuren l'efecte del polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 en les dones sobre el risc que un pacient canviï d'estadi d'insuficiència renal (canvi d'estadi) i el risc que un pacient disminueixi a la meitat l'MDRD (½ MDRD).

Tal com mostren les *taules 39 - 47*, només el polimorfisme I/D del gen ACE1 mostra un efecte significatiu en el risc que la velocitat de filtració glomerular disminueixi a la meitat. Concretament, el fet de tenir el genotip DD explica que el risc de disminuir a la meitat l'MDRD es multipliqui per 2,1 (1,1 a 3,9) respecte al genotip II. És a dir, els individus DD tenen el doble de risc que la seva velocitat de filtració glomerular disminueixi a la meitat que els individus II (*taula 39*).

S'ha trobat també un efecte estadísticament significatiu en les dones amb genotip GG respecte les que tenen genotip CC en el polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2. Aquesta troballa la considerem espúria, ja que no és coherent amb el resultat obtingut per les heterozigotes CG. Cal recordar que la *n* del grup de dones homozigotes CC és només de 16. Si agrupem les homozigotes GG respecte les portadores de l'al·lel C es perd la significació estadística (*p*=0,261 dades no mostrades).

**4.2.3.3 Regressions combinant polimorfismes**

Tot i que pràcticament no s'han observat efectes estadísticament significatius en les regressions presentades a l'apartat anterior, seguirem l'esquema general proposat pel desenvolupament del present treball. Seguint els criteris de combinació ja explicats amb anterioritat, es poden fer les següents combinacions:

Pel que fa al **risc de disminuir a la meitat la velocitat de filtració glomerular**, es poden combinar els quatre polimorfismes següents: I/D de l'ACE1, p.M235T de l'AGT, c.186+2053G>A i 1542-361G>C de l'ACE2.

La combinació de dos polimorfismes que ha donat més significació estadística és la formada per I/D de l'ACE1 + p.M235T de l'AGT. El risc de disminuir a la meitat l'MDRD



es multiplica per 1,24 (1,03 – 1,51) per cada al·lel de risc addicional ( $p=0,026$ ). Això significa que un pacient que tingui els 4 al·lells (DD+MM) té un risc de disminuir a la meitat la velocitat de filtració glomerular renal 2,4 vegades més alt que un individu que no tingui cap al·lel de risc.

Les combinacions de tres i quatre polimorfismes no han mostrat efectes estadísticament significatius.

Pel que fa al **risc de passar al següent estadi d'insuficiència renal crònica**, l'única combinació possible és la formada per I/D de l'ACE1 i c.186+2053G>A de l'ACE2 i tampoc no s'observa cap efecte estadísticament significatiu.

Finalment només remarcar que l'estratificació segons si la velocitat de filtració glomerular basal és superior o inferior a 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> no va canviar les tendències observades amb tota la població ni va enfortir la relació dels polimorfismes amb la progressió.

### 4.3 INSTAURACIÓ DE LA NEFROPATIA

L'estudi de la susceptibilitat a patir nefropatia de pacients diabètics de tipus 2 s'ha realitzat amb només 69 controls i 227 casos. Cal tenir ben present que la realització d'aquest apartat s'ha dut a terme sota l'òptica d'un estudi preliminar i que som ben conscients que la *n* dels controls és insuficient per poder emetre conclusions fermes al respecte. Hem dut a terme aquesta aproximació amb l'únic objectiu de veure si obteníem resultats que orientessin cap a alguna conclusió i si valia la pena l'esforç de desenvolupar en un futur aquest estudi amb totes les condicions òptimes que requereix.

Els criteris de classificació en casos i controls es troben descrits a l'apartat 3.1.3. Els dos grups van ser igualats en edat i sexe. El 62,3% dels controls eren homes, enfront del 63,4 % dels casos. D'altra banda, el 60% dels controls eren no fumadors mentre que els no fumadors en els casos suposaven el 68,7%. Les mitjanes de les altres dades recollides per a cada un dels dos grups en el moment d'incloure'ls a l'estudi es poden consultar a la *taula 48*.

Magnitud	Controls (mitjana i IC 95%)	Casos (mitjana i IC 95%)
Edat (anys)	59,0 (57,0 – 61,0)	59,0 (57,9 – 60,2)
MDRD basal (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	75,8 (72,7 – 78,9)	58,7 (56,2 – 61,1)
Pac(Uri)—Excreció de proteïna basal (g/dia)	0,11 (0,09 – 0,13)	1,46 (1,23 – 1,70)
Índex de massa corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	28,8 (27,3 – 30,3)	30,2 (29,5 – 30,8)
Srm—Albúmina (g/L)	43,9 (43,0 – 44,7)	41,7 (41,1 – 42,4)
San—Eritròcits; fr.vol.(hematòcrit)	0,40 (0,39 – 0,41)	0,41 (0,40 – 0,42)
Srm—Colesterol (mmol/L)	5,2 (4,9 – 5,5)	5,9 (5,7 – 6,0)
Hb(San)—Hemoglobina A1c (%)	6,7 (6,3 – 7,0)	7,5 (7,2 – 7,7)
tensió arterial sistòlica (mmHg)	141 (135 – 147)	155 (152 – 159)
tensió arterial diastòlica (mmHg)	79,0 (75,6 – 82,4)	82,4 (80,8 – 84,1)

**Taula 48.** Mitjana i intervals de confiança del 95% (IC 95%) de les característiques recollides a la primera visita al nefròleg.

La distribució genètica de la població d'estudi pel grup de controls i de casos està descrita a les *taules 49-50*, respectivament. Tots els polimorfismes estudiats es troben en equilibri de Hardy-Weinberg (prova de  $\chi^2$ ).

Polimorfisme	Freqüències genotípiques (%) en els controls			$p (\chi^2)$
ACE1	DD (48,6)	ID (40,3)	II (11,1)	0,868
AGT	MM (25,7)	MT (50,0)	TT (24,3)	1,000
AGTR1	AA (58,0)	AC (33,3)	CC (8,7)	0,611
ACE2 c.186+2053G>A	dones: GG (37,5)	AG (45,8)	AA (16,7)	0,979
	homes*: G (62,8)	-	A (37,2)	-
ACE2 c.439+4C>T	dones: CC (66,7)	CT (25,0)	TT (8,3)	0,495
	homes*: C (72,1)	-	T (27,9)	-
ACE2 c.1542-361C>G	dones: CC (33,3)	GC (45,8)	GG (20,8)	0,945
	homes*: C (62,8)	-	G (37,2)	-

**Taula 49.** Freqüències genotípiques -expressades en percentatge- dels 6 polimorfismes genotípats, acompanyades de la significació estadística en la comparació de proporcions (prova de  $\chi^2$ ) obtinguda al comprovar l'equilibri de Hardy-Weinberg en els pacients control.

\*en els homes, les distribucions són al·lèliques en lloc de genotípiques

Polimorfisme	Freqüències genotípiques (%) en els casos			$p (\chi^2)$
ACE1	DD (36,7)	ID (44,9)	DD (18,4)	0,783
AGT	MM (33,7)	MT (51,0)	TT (15,3)	0,857
AGTR1	AA (57,1)	AC (35,7)	CC (7,1)	0,939
ACE2 c.186+2053G>A	dones: GG (51,4)	AG (40,0)	AA (8,6)	0,993
	homes*: G (68,7)	-	A (31,3)	-
ACE2 c.439+4C>T	dones: CC (51,4)	CT (37,1)	TT (11,4)	0,791
	homes*: C (78,5)	-	T (21,5)	-
ACE2 c.1542-361C>G	dones: CC (48,6)	GC (37,1)	GG (14,3)	0,645
	homes*: C (69,4)	-	G (30,6)	-

**Taula 50.** Freqüències genotípiques -expressades en percentatge- dels 6 polimorfismes genotípats, acompanyades de la significació estadística en la comparació de proporcions (prova de  $\chi^2$ ) obtinguda al comprovar l'equilibri de Hardy-Weinberg en els pacients casos.

\*en els homes, les distribucions són al·lèliques en lloc de genotípiques

Per avaluar la susceptibilitat a la nefropatia s'ha utilitzat la regressió logística binària, donat que la variable dependent només pot prendre dos valors categòrics: desenvolupament de nefropatia (casos) / no desenvolupament de nefropatia (controls). Primerament s'han executat models univariants amb cadascuna de les possibles variables de control. S'han escollit les que presentaven diferències estadísticament significatives entre els dos grups (dades no mostrades): Srm—Albúmina; c.massa, Srm—Colesterol; c.subst., Hb(San)—Hemoglobina A1c i tensió arterial sistòlica.

Seguidament s'han dut a terme les regressions logístiques múltiples per cada polimorfisme amb les variables de control escollides (taula 51).

a)

Variables	$e^{\beta}$ (IC 95%)	$p$
<b>ACE1 (DD vs II)</b>	1,0 (0,4 – 2,8)	0,988
<b>ACE1 (ID vs II)</b>	0,9 (0,3 – 2,4)	0,774
Srm—Albúmina; c.massa	0,90 (0,83 – 0,98)	0,013
Srm—Colesterol; c.subst.	1,5 (1,1 – 2,1)	0,015
Hb(San)—Hemoglobina A1c	1,4 (1,1 – 1,8)	0,009
tensió arterial sistòlica	1,02 (1,00 – 1,03)	0,019

b)

Variables	$e^{\beta}$ (IC 95%)	$p$
<b>AGT (MM vs TT)</b>	2,0 (0,8 – 4,7)	0,134
<b>AGT (MT vs TT)</b>	1,5 (0,7 – 3,3)	0,342
Srm—Albúmina; c.massa	0,90 (0,83 – 0,98)	0,016
Srm—Colesterol; c.subst.	1,5 (1,0 – 2,0)	0,027
Hb(San)—Hemoglobina A1c	1,4 (1,1 – 1,8)	0,007
tensió arterial sistòlica	1,02 (1,00 – 1,03)	0,017

c)

Variables	$e^{\beta}$ (IC 95%)	$p$
<b>AGTR1 (AA vs CC)</b>	2,0 (0,5 – 7,5)	0,298
<b>AGTR1 (AC vs CC)</b>	2,2 (0,6 – 8,5)	0,264
Srm—Albúmina; c.massa	0,91 (0,84 – 0,99)	0,023
Srm—Colesterol; c.subst.	1,5 (1,1 – 2,1)	0,021
Hb(San)—Hemoglobina A1c	1,4 (1,1 – 1,9)	0,298
tensió arterial sistòlica	1,02 (1,00 – 1,03)	0,006

d)

Variables	homes (A vs G)		dones	
	$e^{\beta}$ (IC 95%)	$p$	$e^{\beta}$ (IC 95%)	$p$
<b>c.186+2053 (AA vs GG)</b>	0,8 (0,4 – 1,8)	0,571	0,9 (0,2 – 4,4)	0,878
<b>c.186+2053 (AG vs GG)</b>	-	-	1,0 (0,3 -3,0)	0,991
Srm—Albúmina; c.massa	0,90 (0,81 – 1,00)	0,048	-	-
Srm—Colesterol; c.subst.	1,9 (1,2 – 3,0)	0,007	-	-
Hb—Hemoglobina A1c	1,4 (1,0 – 1,9)	0,049	-	-
tensió arterial sistòlica	1,02 (1,00 – 1,04)	0,037	-	-

e)

Variables	homes (C vs T)		dones	
	$e^{\beta}$ (IC 95%)	<i>p</i>	$e^{\beta}$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>c.439+4C&gt;T (CC vs TT)</b>	1,6 (0,7 – 4,1)	0,283	1,4 (0,2 – 9,5)	0,708
<b>c.439+4C&gt;T (CT vs TT)</b>	-	-	1,8 (0,2 – 13,3)	0,562
Srm—Colesterol; c.subst.	1,8 (1,1 – 2,9)	0,012	-	-
Hb—Hemoglobina A1c	1,4 (1,0 – 1,9)	0,042	-	-
tensió arterial sistòlica	1,02 (1,00 – 1,04)	0,031	-	-

f)

Variables	homes (C vs G)		dones	
	$e^{\beta}$ (IC 95%)	<i>p</i>	$e^{\beta}$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>c.1542-361 (CC vs GG)</b>	1,2 (0,5 – 2,6)	0,720	1,0 (0,2 – 3,9)	0,957
<b>c.1542-361 (CG vs GG)</b>	-	-	1,2 (0,3 – 4,9)	0,827
Srm—Colesterol; c.subst.	1,9 (1,2 – 3,0)	0,008	-	-
Hb—Hemoglobina A1c	1,4 (1,0 – 1,9)	0,048	-	-
tensió arterial sistòlica	1,02 (1,00 – 1,04)	0,038	-	-

**Taula 51.** Coeficient de la regressió logística ( $e^{\beta}$ ) interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model que mesura la susceptibilitat dels pacients diabètics de tipus 2 a desenvolupar nefropatia:

- dels genotips DD i ID del polimorfisme I/D del gen ACE1 respecte el genotip II
- dels genotips MM i MT del polimorfisme M268T del gen AGT respecte el genotip TT
- dels genotips AA i AC del polimorfisme g.1166A>C del gen AGTR1 respecte el genotip CC.
- de l'al·lel A del polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 respecte l'al·lel G en homes i dels genotips AA i AG respecte el genotip GG en dones.
- de l'al·lel C del polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2 respecte l'al·lel T en homes i dels genotips CC i CT respecte el genotip TT en dones.
- de l'al·lel C del polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 respecte l'al·lel G en homes, i dels genotips CC i CG respecte el genotip GG en dones.

No s'observa cap efecte del genotip sobre la susceptibilitat a desenvolupar nefropatia en pacients diabètics de tipus 2. Totes les significacions estadístiques obtingudes en les regressions logístiques són superiors a 0,2 –exceptuant el cas aïllat del genotip MM vs TT del polimorfisme p.M235T de l'AGT–. Per tant, no s'han pogut dur a terme combinacions entre els gens.

Tal com s'ha comentat a l'inici del present apartat no es poden emetre conclusions dels resultats obtinguts, però la manca de tendències descoratja l'estudi ulterior de la susceptibilitat dels pacients diabètics de tipus 2 a desenvolupar nefropatia en funció del genotip en la nostra població.

## 4.4 CARACTERÍSTIQUES METROLÒGIQUES

Com ja s'ha comentat a l'apartat 3.4.3, es van fer servir diversos mètodes per genotipar els pacients.

Pels quatre polimorfismes (g.1166A>C del gen *AGTR1*, p.M235T del gen *AGT*, c.186+2053G>A i c.439+4C>T del gen *ACE2*) que inicialment es van genotipar mitjançant PCR-RFLP i posteriorment es va canviar la metodologia a PCR a temps real, es van processar 20 mostres de cada polimorfisme per ambdós mètodes amb la finalitat de comprovar la intercanviabilitat de resultats. Per a tots els polimorfismes, la classificació dels genotips va ser coincident en el 100% de mostres.

A més a més, a cada reacció de PCR pel mètode PCR-RFLP s'adjuntava una mostra d'un pacient heterozigot pel polimorfisme –que ja havíem genotipat amb anterioritat– com a control intern de la qualitat del procediment. Es van fer entre 6 i 10 sèries de cada un dels polimorfismes genotipats amb aquesta metodologia i en totes elles la mostra heterozigota es va poder identificar inequívocament.

Pel que fa a la metodologia de corbes de dissociació amb PCR a temps real (polimorfisme I/D de l'*ACE1*) es van realitzar 17 sèries amb un únic control heterozigot per sèrie. I posteriorment es va dur a terme la PCR confirmatòria amb 17 sèries més, cada una d'elles també amb un control heterozigot.

Pel que fa a la metodologia de PCR a temps real amb sondes al·lel-específiques, per a cada sèrie s'han introduït tres mostres (homozigot majoritari, heterozigot i homozigot minoritari) com a controls interns de la qualitat i que ja s'havien genotipat anteriorment. Es van dur a terme entre 7 i 16 sèries per a cada un dels polimorfismes genotipats. Una de les sèries del polimorfisme c.439+4C>T del gen *ACE2* es va haver de repetir en la seva totalitat perquè les mostres no van amplificar-se degudament, però en la resta de sèries, els tres controls es van poder classificar correctament.

Així doncs, la concordança entre PCR-RFLP i PCR a temps real va ser del 100% (**n=80** mostres) i la reproductibilitat va ser també del 100% (**n=212** controls distribuïts en: metodologia PCR-RFLP: 31 sèries amb un control heterozigot per sèrie  $n=31$ ; metodologia PCR a temps real amb corbes de dissociació: 34 sèries amb un control heterozigot per sèrie  $n=34$ ; metodologia PCR a temps real amb sondes al·lel-específiques: 49 sèries amb tres controls per sèrie  $n=147$ ).

## **5. DISCUSSIÓ**





## El sistema renina-angiotensina

El sistema renina-angiotensina constitueix un mecanisme importantíssim en la patogènesi de la nefropatia del pacient diabètic (19, 20). El RAS és el regulador més ben conegut de la tensió arterial i determina els òrgans diana que es malmeten per causa de la hipertensió (22). La producció local a les cèl·lules renals d'angiotensina II incrementa la pressió intraglomerular mitjançant la constricció de les arterioles eferents i per tant contribueix al desenvolupament i progressió de la glomeruloesclerosi observada en aquesta malaltia. Controla el balanç de fluids i electròlits a través d'efectes coordinats entre el cor, els vasos sanguinis i els ronyons. La hipertensió intracapil·lar i la filtració incrementada de proteïnes plasmàtiques poden contribuir al desenvolupament i progressió de la lesió renal. Els efectes no hemodinàmics de l'angiotensina II també poden ser importants en la progressió de la nefropatia: s'ha demostrat que l'angiotensina II és capaç d'estimular la producció de diverses citocines, com el TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*) i permetre la sobreacumulació de proteïnes de la matriu extracel·lular (87). La descoberta de l'enzim convertidor d'angiotensina I de tipus 2 ha incrementat la complexitat del RAS conferint encara més interès al seu estudi. L'angiotensina 1-7, un heptapèptid derivat de l'angiotensina II per l'acció d'aquest enzim bloqueja l'acció de l'angiotensina II, especialment en situacions de sobreactivitat del RAS, com per exemple durant la restricció de la ingesta de sodi. Aquest procés desemboca en una vasodilatació renal i un increment de l'excreció de sodi a la orina. Hi ha també molts altres pèptids del RAS que encara es troben sota investigació (22).

L'existència de factors genètics en el desenvolupament i progressió de la nefropatia en els pacients diabètics es considera una realitat per a la majoria d'autors. Es basen en estudis epidemiològics, que per una banda confirmen que únicament el 35% de pacients diabètics de tipus 2 desenvolupen nefropatia (2) lligat al fet que es produeix un estancament de la prevalença passats els 20 anys del començament de la diabetis (4), i per una altra demostren agrupació familiar (*familial clustering*) dels pacients diabètics que pateixen nefropatia (2, 43, 44, 46). Alguns autors (88) postulen que l'efecte de la variabilitat genètica no està tan clar, basant-se en la multitud d'estudis d'expressió genètica d'associació i de lligament que s'han dut a terme i que no han estat vàlids per identificar mutacions que expliquin el desenvolupament de la nefropatia. La dificultat en trobar explicacions exactes i precises del paper que desenvolupa la genètica rau probablement en que els polimorfismes no són marcadors simples de prognosi renal ni de resposta al tractament terapèutic i hi ha molts altres factors implicats. Tot i això, és indiscutible el paper crucial que juga la genètica sobre la nefropatia i la insuficiència renal crònica terminal en la diabetis (89).

### **Estratègia en la tria dels polimorfismes**

Hi ha tres principals estratègies per identificar quins factors genètics determinen susceptibilitat a una malaltia (90). L'opció més simple és l'anomenada "*single gene approach*" on es mira l'associació amb un únic gen. La segona opció seria l'anomenada "*candidate pathway-gene approach*", és a dir, es miren diversos gens que es troben dins d'una mateixa ruta metabòlica. I finalment una tercera possibilitat és l'anomenada "*genome-wide analysis*", és a dir, anàlisi de tot el genoma. Si s'estudia un únic gen (*single gene approach*) es perd la possibilitat d'estudiar associacions genètiques que puguin estar relacionades amb la mateixa malaltia. Aquesta estratègia ha estat àmpliament criticada ja que la troballa d'un efecte genètic particular en l'estudi de malalties multifactorials i multigèniques pot ser del tot casual. Els resultats depenen en gran mesura del correcte aparellament de casos i controls: si s'estudia de forma retrospectiva es pot concloure erròniament que un genotip està relacionat amb la malaltia si es troba sobrerrepresentat en la població de casos, quan potser el que indica és un efecte protector de la mortalitat. Tot això juntament amb la manca de semblança dels pacients que s'estudien a cada publicació pot explicar la poca reproductibilitat que s'observa a la bibliografia. Si, per contra, s'estudia tot el genoma (*genome-wide analysis*) és molt fàcil trobar falses associacions i a més als resultats que s'obtenen costa trobar-los una explicació biològica. Hi ha dipositada una gran esperança en aquesta aproximació, però fins al moment els resultats no han estat consistents (91). En canvi, si s'estudien diversos gens pertanyents a una via metabòlica (*candidate pathway-gene approach*), es minimitza el risc d'obtenir falsos positius, els resultats poden ser biològicament plausibles i es permet estudiar possibles associacions entre ells. Les accions conegudes de l'angiotensina II fan que el sistema renina-angiotensina sigui un candidat atractiu degut a la seva implicació en la patogènesi i la progressió de la nefropatia en pacients diabètics. Aquest és el motiu pel qual al present treball s'han escollit diversos gens pertanyents a aquest sistema.

S'han considerat 6 polimorfismes de gens del sistema renina-angiotensina. L'I/D de l'enzim convertidor d'angiotensina I (*ACE1*), el p.M235T de l'angiotensinogen (*AGT*) i el g.1166A>C del receptor d'angiotensina de tipus 1 (*AGTR1*) són, per ordre, els tres polimorfismes més estudiats fins al moment a la nefropatia diabètica. El fet que s'hagin fet força publicacions però que existeixi un alt grau de controvèrsia entre elles, ens ha motivat a incloure'ls al nostre estudi. A més a més, hem determinat tres polimorfismes més pertanyents al gen que codifica per l'enzim convertidor d'angiotensina I de tipus 2 (*ACE2*): rs4646124 (c.186+2053G>A), rs2285666 (c.439+4C>T) i rs879922 (c.1542-361C>G). Els motius que ens han guiat cap a la tria d'aquests tres polimorfismes entre

els 317 descrits fins al moment, obeeixen especialment a la practicabilitat. Es va fer una tria d'aquells polimorfismes amb freqüències al·lèliques minoritàries superiors al 30%, que ens permet esperar al voltant d'un 9% de casos amb el genotip homozigot minoritari. Aquest percentatge garanteix un nombre suficient d'individus per les anàlisis estadístiques posteriors. Dels que complien aquesta condició, es van seleccionar els que eren susceptibles de ser genotipats per la metodologia clàssica (PCR-RFLP) o bé mitjançant la tecnologia Taqman® (Applied Biosystems); i finalment, de tots ells es van seleccionar tres polimorfismes que pertanyessin a tres haplotips diferents: dos d'ells (c.186+2053G>A i c.1542-361C>G) del projecte *hapmap* (vegeu l'apartat 3.4.5) i un tercer (c.439+4C>T) descrit a l'NCBI (consulteu l'apartat 3.4.6).

### **Hipòtesi de la tesi**

La hipòtesi plantejada en aquesta tesi és que, en pacients diabètics de tipus 2, a més a més dels factors de risc no genètics, els polimorfismes dels gens del sistema renina-angiotensina poden influir en tres situacions diferents de la nefropatia: la instauració, la progressió i finalment la mortalitat dels pacients que ja han perdut completament la funcionalitat renal. A banda de l'efecte individual de cada polimorfisme, també ens hem ocupat d'estudiar interaccions entre ells basant-nos en un possible efecte poligènic sobre la nefropatia i observar així interaccions entre gens considerats a priori *poc influents*.

La idea que els efectes dels polimorfismes poden interaccionar entre ells en pacients diabètics va ser introduïda per Marré *et al.* en un estudi amb diabètics de tipus 1 (92) i ha estat recolzada posteriorment per altres autors (80, 86, 93). Entre els mecanismes subjacents de la interacció genètica, un suggeriment seria que la sobreregulació d'un component genètic del RAS es compensa per la subregulació dels altres gens, obtenint en conjunt una activació escassa del sistema. Contràriament, quan diversos gens que codifiquen per diversos components del RAS són alterats de forma simultània, el sistema no és capaç de compensar i té lloc una activació sinèrgica del RAS (73).

En el nostre treball, hem trobat una relació significativa de la interacció d'alguns dels polimorfismes del RAS amb la progressió i amb la mortalitat, però no amb la susceptibilitat. A continuació comentarem detalladament els criteris adoptats per nosaltres i els resultats que considerem d'especial importància, per a cadascun dels tres apartats.

## LA MORTALITAT EN DIÀLISI

La mortalitat en diàlisi s'ha estudiat de forma retrospectiva fent un seguiment de pacients diabètics de tipus 2 des de la data d'incorporació al programa de diàlisi. Ha tingut per objectiu l'estudi de les interaccions entre els diversos polimorfismes de gens del RAS i la mortalitat en diàlisi. Amb aquesta finalitat s'ha fet una anàlisi de la supervivència mitjançant corbes de supervivència i regressions de Cox i s'ha observat un efecte combinat estadísticament significatiu d'alguns dels polimorfismes estudiats.

### Variables de control

Controlar per variables de confusió és molt útil en estudis retrospectius, quan la població en estudi pot no estar homogèniament distribuïda respecte aquestes mateixes variables. És una forma d'assegurar que no s'adjudiqui falsament un efecte a un polimorfisme degut a que una tercera variable –la que provoca realment l'efecte– estigui més representada en un genotip que en un altre de manera casual. En el present estudi, a més a més dels factors genètics, també s'han considerat altres possibles factors de risc de mortalitat independents:

- 1) El sexe. S'ha hagut de tenir en compte que el gen *ACE2* es troba al cromosoma X, i per tant els homes només tenen una dotació al·lèlica. D'altra banda és sabut que el gènere influeix en la mortalitat general, ja que els homes tenen una esperança de vida inferior a les dones. Palmer *et al.* (94) documenta l'existència d'una supervivència menor dels homes quan estudia l'efecte d'un polimorfisme de l'*ACE2* sobre la supervivència.
- 2) La velocitat de filtració glomerular a la primera visita al Servei de Nefrologia. Diversos estudis han demostrat que la derivació a temps a l'especialista hospitalari és un predictor de millor supervivència tant per hemodiàlisi com per diàlisi peritoneal (95, 96). Concretament asseguren que la identificació precoç de la insuficiència renal crònica pot ajudar a retardar o prevenir la seva progressió, tot i que s'admet que les oportunitats de realització d'un cribratge sistemàtic encara no estan prou ben definides (97).
- 3) Història d'accidents cardiovasculars previs a la diàlisi, ja que constitueixen un factor de risc clínic inicial.
- 4) Història prèvia d'hipertensió no controlada. Quasi el 70% de pacients diabètics tenen hipertensió quan se'ls diagnostica de nefropatia (25).
- 5) L'edat a l'inici de la diàlisi. És evident que la probabilitat de morir és més alta en el fragment de població amb edat avançada que no pas entre els més joves. Tot i això, la nostra població d'estudi presenta un quadre clínic complex degut a

complicacions derivades de la diabetis i de la nefropatia que probablement determinen amb molta més importància el risc de morir que no pas l'edat.

- 6) La funció renal residual a l'inici del tractament amb diàlisi. Diversos estudis conclouen que no hi ha diferències estadísticament significatives entre la funció renal a l'inici de diàlisi i la subsegüent mortalitat, és a dir que l'inici de diàlisi a valors més alts de velocitat de filtració glomerular no mostra cap avantatge quant a la supervivència respecte als pacients que inicien el tractament amb filtracions glomerulars més baixes. Però altres estudis suggereixen que una pitjor funció renal a l'inici de diàlisi està associada a un increment de mortalitat i morbiditat (98).
- 7) La modalitat de diàlisi inicial (hemodiàlisi o diàlisi peritoneal). Encara que no hi hagi cap evidència convincent que justifiqui l'ús inicial d'una modalitat de diàlisi sobre l'altra (99), l'inici de diàlisi peritoneal, probablement preserva millor la funció renal residual (100).
- 8) San—Leucòcits; c.núm basal: constitueix un marcador de septicèmia en el moment d'instaurar la diàlisi i un marcador de mal pronòstic. Tot i que s'han descartat els pacients que han mort en un temps inferior als 3 mesos precisament per intentar evitar que la causa que produeix el desenllaç fos prèvia a la diàlisi, s'ha cregut convenient incloure igualment un marcador de procés infecció per si podia estar relacionat amb morts més tardanes.
- 9) San—Hemoglobina; c.massa i Srm—Albúmina; c.massa: són marcadors de l'estat nutricional del pacient. Keane *et al.* van identificar la hipoalbuminèmia i l'anèmia com a predictors de desenvolupament d'insuficiència renal crònica terminal (101, 102). La detecció i el tractament de malnutrició contribueix a la millora de la supervivència dels pacients que reben diàlisi (103).
- 10) Srm—Colesterol; c.subst: és un marcador de dislipèmia i com a tal és un factor de risc independent d'infart agut de miocardi (104).
- 11) Hb(San)—Hemoglobina A1c; fr.subst: tractant-se de pacients diabètics de tipus 2, el control de la concentració de glucosa plasmàtica és essencial en tot el seu procés patològic. Cal tenir en compte, però, que la glicohemoglobina no és suficientment representativa del control de la concentració de glucosa en sang dels pacients en hemodiàlisi. Degut a la disminució del metabolisme general, la anèmia i la vida més curta dels eritròcits, la glicohemoglobina pot ser falsament elevada en aquests pacients (104). Això afecta únicament al valor discriminant, el qual no es té en consideració en aquesta tesi.

A les regressions de Cox presentades en el present treball, es pot comprovar com l'única variable de control estadísticament significativa que apareix en pràcticament tots els models és Srm—Albúmina; c.massa.

### L'efecte genètic i els al·lels de risc

A la regressió de Cox individual de cada polimorfisme, l'I/D de l'ACE1 i el p.M235T de l'AGT presenten efectes significatius sobre la mortalitat. Concretament el genotip DD explica un augment del risc de mortalitat de 3,5 (1,3 – 9,9) vegades el dels pacients II, i el genotip MM al seu torn explica un augment del risc de mortalitat de 3,8 (1,2 – 12,4) vegades el dels pacients TT. És notori destacar que el coeficient de regressió està estimat amb un elevat error estàndard, fet que explica per què els intervals que l'acompanyen estan tan pobrament acotats.

Tal com s'anirà observant al llarg de la presentació dels resultats d'aquesta tesi, dos dels polimorfismes de l'ACE2 tenen cert efecte en els homes però no es reproduïx en el grup de dones. Aquest fenomen ja ha estat descrit amb anterioritat (94). La proporció d'aquestes és inferior a la dels homes a la mostra que estem estudiant (per l'estudi de diàlisi, 56 homes davant de 44 dones) i aquesta realitat, juntament amb el fet que les dones tenen tres genotips –i presumiblement tres fenotips i per tant major complexitat– mentre que els homes només dos, podria contribuir a aquesta troballa. Recordem que degut a que hi ha menys del 10% de dones amb el genotip minoritari, s'han agrupat amb el grup d'heterozigotes per a l'estudi estadístic, diluint probablement l'efecte que estudiem.

Amb l'objectiu de millorar l'estimació del risc i explorar si els polimorfismes actuen conjuntament sobre la mortalitat, s'ha dut a terme un estudi conjunt de les variants al·lèliques. Per a això, s'han identificat els al·lels que potencialment poden conferir risc de mortalitat basant-nos en les tendències observades a les corbes de supervivència de Kaplan-Meier i en les significacions estadístiques obtingudes de les regressions individuals. D'aquesta manera, dos dels sis polimorfismes (g.1166A>C de l'AGTR1 i c.439+4C>T de l'ACE2) han estat eliminats de l'estudi subsegüent per resultar impossible la identificació dels al·lels que podien conferir susceptibilitat a morir.

Per la resta de polimorfismes, s'ha considerat que els al·lels que confereixen risc de morir són: **D** (I/D), **M** (p.M235T), **G** (c.186+2053G>A) i **C** (c.1542-361C>G). Quant a l'al·lel D, la seva assignació com a variant de risc és consistent amb la bibliografia publicada respecte a la mortalitat dels pacients en diàlisi. No hi ha bibliografia concloent respecte al polimorfisme p.M235T, i finalment els tres polimorfismes del gen ACE2 no havien estat mai estudiats en la mortalitat de pacients en diàlisi.

### Comparació amb la bibliografia

Comparativament amb els estudis que s'ocupen de la susceptibilitat i progressió de la nefropatia, hi ha molts menys treballs que hagin explorat el paper d'aquests polimorfismes en la mortalitat dels pacients diabètics de tipus 2 en diàlisi, i encara menys que ho hagin fet amb població blanca.

Dels polimorfismes inclosos en aquest treball, el més àmpliament estudiat en la mortalitat és l'I/D de l'ACE1. L'al·lel D s'ha relacionat amb la mortalitat d'origen cardiovascular en diversos metanàlisis; concretament, la presència d'aquest al·lel s'ha associat amb un increment de l'ateroesclerosi i de les complicacions microvasculars renals, així com malaltia coronària, infart de miocardi, ictus i nefropatia diabètica (105). Hadjadj *et al.* han corroborat aquestes troballes mitjançant un estudi amb 3126 diabètics de tipus 2 que els ha permès relacionar l'al·lel D amb una major probabilitat de mort d'origen cardíac (106). Aquests resultats han estat contradits amb posterioritats en un altre metanàlisi en població blanca (107).

També existeix certa controvèrsia en els estudis que intenten predir la mortalitat en pacients en diàlisi en funció dels polimorfismes del RAS: Higashiesato *et al.* van avaluar el risc relatiu de mort en 727 pacients hemodialitzats japonesos, i van concloure que el polimorfisme I/D de l'ACE1 no prediu la supervivència a curt termini (54). El principal inconvenient d'aquest estudi és que van fer un seguiment de 2 anys dels pacients i encara que ajustessin per l'edat a l'inici de diàlisi, no van incorporar el temps que portaven prèviament en diàlisi als models de regressió. Yoshida *et al.* (76), en un estudi amb 168 pacients van concloure que el genotip DD incrementa el risc de morir una vegada la diàlisi ja ha estat iniciada. Aquest mateix estudi no va poder demostrar l'existència de relació entre la mortalitat en diàlisi i els polimorfismes p.M235T de l'AGT i g.1166A>C de l'AGTR1. Coincidint amb l'autor anterior, s'ha reportat que la mortalitat dels pacients amb genotip DD (ACE1) és 2,3 vegades superior que pels portadors de l'al·lel I en diabètics d'origen nipó en diàlisi (108). Aquest risc ha estat reproduït en 456 pacients blancs sota el mateix tractament (55). En un estudi amb 534 pacients en hemodiàlisi de més de tres anys de durada, es va observar que l'al·lel D constituïa un factor de risc de desenvolupament de complicacions cardiovasculars (56).

Böger *et al.* van intentar esbrinar l'associació de la interacció entre els polimorfismes I/D de l'ACE1, p.M235T de l'AGT i g.1166A>C de l'AGTR1 i el tractament farmacològic amb IECA o ARA-II, amb la mortalitat de 445 pacients germànics amb nefropatia diabètica i hemodialitzats. Únicament van trobar un increment del risc de morir

estadísticament significatiu en el grup en tractament amb ARA-II i, a la vegada, homozigots AA del polimorfisme g.1166A>C (109).

Tal com s'ha comentat, hi ha molt poca bibliografia disponible que explori el paper d'altres polimorfismes del RAS exceptuant l'I/D de l'ACE1 en la mortalitat de pacients en diàlisi. Si fem la recerca més restringida incloent només pacients diabètics de tipus 2 trobem únicament el mencionat article de Böger *et al.*, encara que el seu disseny distava molt del nostre donat que avaluaven la interacció del genotip amb el tractament farmacològic. Si es fa una recerca bibliogràfica al pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) amb les paraules *agt + survival + dialysis* s'obtenen només dos articles, un dels quals és del nostre grup de treball. I si es fa el mateix per l'ACE2 no se'n troba cap. El gen ACE2 ha estat implicat en la hipertensió i de retruc, en la patologia cardíaca. La supervivència de pacients amb síndrome coronari agut ha estat explorada per Palmer *et al.* (94). Van concloure que existia una relació entre la mortalitat i un polimorfisme no inclòs en aquesta tesi, únicament en els homes. Per altra banda, l'al·lel minoritari G del polimorfisme c.1542-361C>G sembla que pot estar relacionat amb un engruiximent de la paret septal i hipertròfia cardíaca (57, 69). Aquesta dada, contrasta amb la relació que hem trobat nosaltres entre l'al·lel C i la mortalitat per qualsevol causa, fet que encara no havia estat mai estudiat.

### Conclusions principals

Al nostre treball, classificant els pacients en funció del nombre d'al·lells de risc –**D** (I/D), **M** (p.M235T), **G** (c.186+2053G>A) o **C** (c.1542-361C>G)– que tenia cada un d'ells (de 0 a 8) i duent a terme totes les possibles combinacions entre els polimorfismes (de 2 en 2, de 3 en 3 i el conjunt dels 4), es va trobar que la combinació que estimava amb més precisió el risc de mortalitat era la formada per ACE1, AGT i c.186+2053G>A de l'ACE2: risc relatiu = 1,5 (IC 95% = 1,2 a 1,9) amb una significació estadística de 0,002. Això significa que per cada al·lel de risc addicional, el risc de mortalitat augmenta 1,5 vegades, i per tant tenir els sis al·lells fa que el risc de morir es multipliqui per 11 ( $1,5^6$ ) respecte no tenir cap al·lel de risc.

El polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 no sembla tenir un paper destacat en el risc de mortalitat a la diàlisi, ja que el risc relatiu en pacients diabètics en diàlisi pràcticament no es modifica si s'elimina aquesta variable de la suma d'al·lells de risc.



## ESTUDI DE LA PROGRESSIÓ DE LA NEFROPATIA

### Selecció dels pacients

Per al segon apartat d'aquesta tesi, l'estudi de la progressió de la nefropatia, hem inclòs 320 pacients diabètics de tipus 2 que a més a més complien els criteris de diagnòstic d'insuficiència renal crònica emesos per la NKF-KDOQI (6): o bé la troballa de resultats patològics dels marcadors de deteriorament de la funció renal (per exemple proteïnúria persistent, és a dir excrecions de proteïna en orina superiors a 0,15 g/dia en més de dues mostres puntuals) o bé una velocitat de filtració glomerular inferior a 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> durant més de tres mesos consecutius.

El diagnòstic definitiu de nefropatia diabètica passa per una biòpsia renal, la qual majoritàriament no es va dur a terme en els nostres pacients –només en 12 casos–. Sotmetre aquests pacients a biòpsia no és fàcil perquè majoritàriament prenen antiagregants plaquetaris per disminuir el risc de malaltia cardiovascular i per tant cal suprimir-los prèviament el tractament amb els riscos que això comporta. Generalment, es recorre a altres criteris per al diagnòstic de nefropatia diabètica. Segons les guies internacionals de la KDOQI (110), la insuficiència renal crònica pot ser atribuïble a la diabetis sempre que hi hagi macroalbuminúria. Addicionalment, hi ha altres troballes que permeten recolzar aquest diagnòstic com és l'increment progressiu de l'albuminúria i l'observació de la imatge d'un ronyó hipertrofiat en una ecografia abdominal juntament amb una hiperfiltració renal confirmada per radioisòtops, en un estadi incipient de la malaltia.

Alguns autors han proposat que la retinopatia sigui també un criteri diagnòstic de nefropatia diabètica (4). La retinopatia està clarament relacionada amb la durada de la diabetis i amb el control de la glucèmia (111). Com que es podria donar el cas que s'evidenciés abans la nefropatia que no pas la retinopatia, no ens sembla que l'absència de retinopatia confirmi categòricament que la nefropatia que pateix un pacient no sigui d'origen diabètic (112). Cal esmentar que 77 dels 320 pacients inclosos a l'estudi de la progressió –un 24 %– no van presentar retinopatia. Aquesta dada és coincident amb la presentada per Ahluwalia *et al.* (80) que descriu que només el 76,3% dels pacients diabètics de tipus 2 amb nefropatia diabètica presenten retinopatia. Per ser rigorosos, quan ens hem referit als pacients inclosos en aquest treball hem intentat emprar l'expressió “diabètics de tipus 2 amb nefropatia” en comptes de “nefropatia diabètica” donada la dificultat existent en emetre el diagnòstic definitiu.

Està descrit que en tots els pacients amb diabetis mellitus, inclosos els que mai desenvoluparan nefropatia, pot observar-se microalbuminúria (excreció d'albúmina en

orina entre 30 i 300 mg/dia) en coincidència amb un mal control metabòlic o exercici físic intens (4). No hi ha cap risc que els pacients que es troben en aquesta situació formin part del nostre estudi, ja que, com s'ha comentat anteriorment, el criteri d'inclusió contempla únicament la proteïnúria quan aquesta es troba mantinguda un mínim de tres anys consecutius (perquè els pacients tenen un seguiment anual).

Dels criteris de selecció que hem emprat es pot deduir que hi haurà un biaix en els nostres resultats. Al present estudi no s'han inclòs els pacients que, trobant-se en un estadi incipient d'insuficiència renal –amb microalbuminúria com a únic signe objectiu–, van respondre amb eficàcia al tractament farmacològic. L'únic motiu és la impossibilitat de diagnosticar-los de nefropatia, donat que la presència de microalbuminúria no és un criteri suficient. Això fa que els pacients que han tingut un millor pronòstic no estiguin presents a l'estudi. Si les tendències observades a la nostra població es confirmessin en els pacients amb millor pronòstic, probablement les diferències que s'observen en aquest treball encara podrien ser majors.

Som conscients de la complexitat clínica del pacient diabètic amb nefropatia, que dificulta molt la tasca d'homogeneïtzar aquesta població i poder-la estudiar conjuntament. Hem realitzat diversos plantejaments en aquest sentit com són l'exclusió dels pacients monorenals i dels que presentaven una velocitat de filtració glomerular inferior a  $30 \text{ mL/min/1,73m}^2$  (estadis 4 i 5) a la primera visita a l'especialista. L'ideal hagués estat partir de pacients pertanyents a un únic estadi d'insuficiència renal crònica i veure'n l'evolució. Per no reduir tant el nombre de pacients de l'estudi, finalment només es van excloure els pertanyents als estadis 4 i 5, ja que en aquest punt la malaltia ja està tan avançada que és molt difícil valorar-ne la progressió.

El desconeixement precís de l'inici de la insuficiència renal també esdevé un inconvenient insalvable. Més del 70 % dels pacients són remesos des dels centres d'atenció primària als serveis de nefrologia amb una insuficiència renal crònica d'estadis 3-5, plenament establerta i inclús molt evolucionada (7). A falta d'un criteri més objectiu, el seguiment dels pacients al nostre estudi s'inicia a la primera visita al Servei de Nefrologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge, que és quan en comencem a recollir les dades.

### **Avaluació de la progressió de la nefropatia**

La velocitat de filtració glomerular renal és el millor estimador de la funció renal. Les guies internacionals emeses per la International Kidney Foundation (6, 8, 12) recomanen estimar la filtració glomerular mitjançant l'ús de la fórmula matemàtica MDRD que inclou l'edat, el sexe, la raça i la concentració de creatinini, albúmina i urea en sèrum. L'únic inconvenient que té és que subestima les filtracions glomerulars dels individus sans, i per tant el valor discriminant es situa a 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup>. Està especialment indicada en pacients amb insuficiència renal crònica, com és el nostre cas.

En contraposició al consens aconseguit en l'estimació de la velocitat de filtració glomerular renal mitjançant l'MDRD, no hi ha un criteri únic per valorar la progressió de la nefropatia que estigui recomanat internacionalment. Probablement aquesta heterogeneïtat és una de les causes de la divergència en els resultats publicats. Per intentar elucidar la importància que pot tenir la tria de criteris diferents en l'elaboració de les conclusions, vam incloure diverses formes de valorar la progressió. Concretament són 4 criteris que empen l'MDRD i els 3 restants són rèpliques dels primers però que usen la concentració de creatinini en el plasma en comptes de l'MDRD (els primers, mostrats a l'apartat de resultats i els darrers als annexos). A conseqüència del consens del que hem parlat, sostenim que els criteris per valorar la progressió de la nefropatia han d'emprar l'MDRD. El fet que haguem inclòs també criteris que emprin el creatinini ha obeït únicament a la voluntat de presentar uns resultats comparables amb la bibliografia, on bona part de publicacions treballen amb la concentració plasmàtica de creatinini (75, 76).

Per una banda, la progressió de la nefropatia s'ha calculat com el risc de doblar la concentració plasmàtica de creatinini, passar a un estadi superior d'insuficiència renal crònica o disminuir a la meitat la velocitat de filtració glomerular renal estimada. Els dos primers criteris han estat vastament emprats per molts autors (73-75) per decidir si la nefropatia d'un pacient havia progressat al final de l'estudi. L'estudi RENAAL –Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Receptor Antagonist Losartan– analitza l'efecte del fàrmac *losartan*, antagonista del receptor d'angiotensina II sobre la progressió de la nefropatia, i per avaluar la progressió fa un seguiment dels pacients fins que un dels següents punts finals es produeix: o que la concentració plasmàtica de creatinini es dobli, o que s'entri a l'estadi d'insuficiència renal crònica terminal que correspon al cinquè estadi –ESRD segons els americans: *end stage renal disease*– o bé que es produeixi la mort del participant (101). En el nostre cas, tots els individus que o bé s'han mort o bé han entrat al cinquè estadi d'insuficiència renal

crònica, prèviament ja havien doblat la seva concentració de creatinini o disminuït a la meitat l'MDRD, per això no hem considerat l'establiment de punts finals compostos.

Per l'altra banda, la progressió de la nefropatia també s'ha calculat amb pendents i diferències relatives tant d'MDRD com de creatinini –tenien signe negatiu per l'MDRD i positiu pel creatinini–. A diferència de les variables de control que tenen seguiment, hem tingut interès únicament en el punt final per conèixer fins on ha progressat la nefropatia. Pels pacients que han entrat en diàlisi, el final del seguiment s'ha considerat la primera de les filtracions glomerulars d'estadi 5 per no fer els pendents erròniament més suaus. Com que el grup de pacients inclosos a l'estudi són heterogenis pel que fa al temps de seguiment, la mesura de la progressió s'ha estandarditzat sempre pels anys de seguiment. Pel que fa a l'heterogeneïtat produïda per la divergència d'estadis de la insuficiència renal amb els que arriben els pacients a la consulta del nefròleg (estadis 1, 2 i 3), s'ha resolt incloent l'MDRD basal (o la concentració plasmàtica de creatinini basal) al model de regressió.

Val la pena remarcar un darrer apunt sobre el càlcul de la disminució relativa percentual anual de la velocitat de filtració glomerular renal. La fórmula correcta per calcular-la està desenvolupada a l'annex A. Intuïtivament, hom podria pensar que el càlcul correcte passa per fer la diferència relativa dels MDRD inicial i final en percentatge i dividir tot això pels anys de seguiment per estandarditzar pel temps de seguiment. És a dir:

$$dif\ rel\ anual = \frac{\frac{crea_F - crea_B}{crea_B} \times 100}{anys\ seguiment}$$

Però aquesta fórmula és errònia per calcular un increment **relatiu constant anual** tal com es pot veure amb el següent exemple:

Suposem que un pacient parteix d'un MDRD inicial de 90 mL/min/1,73m<sup>2</sup> i que presenta pel primer i segon any de seguiment un MDRD de 85 i 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup> respectivament. Si calculem la diferència anual relativa amb la fórmula que hem emprat a la tesi obtenim una progressió de -18,4% anual, mentre que si ho calculem amb la fórmula *errònia* dona -16,7% anual. Ara apliquem aquest percentatge a cada any. Amb la fórmula *bona* obtenim que pel primer any l'MDRD teòric seria de 73 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (90 menys el 18,4% de 90) mentre que pel segon any seria de 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (73 menys el 18,4% de 73), exactament la velocitat de filtració glomerular renal que el pacient presentava al segon any de seguiment. En canvi, si apliquem el percentatge amb la fórmula *errònia*, obtenim que pel primer any l'MDRD seria de 75 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (90 menys el 16,7 % de 90) mentre que pel segon any seria

de 62 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (75 menys el 16,7% de 75). La velocitat de filtració glomerular que obtenim no és exactament la que presenta el pacient al segon any, i aquest error que s'observa és més gran com més anys hi ha de seguiment.

### **Variables de control**

La inhibició del RAS, el control intensiu de la pressió arterial, un bon control metabòlic de la diabetis i la millora de la dislipèmia, juntament amb una adaptació de l'estil de vida, poden aconseguir la remissió de la proteïnúria i l'estabilització de la funció renal en una proporció substancial de pacients amb proteïnúria (22). Als nostres models multivariants s'han inclòs diverses variables que recullen els factors que poden estar relacionats directament amb la progressió de la nefropatia:

- 1) Edat. En general, l'edat està relacionada amb una major progressió, però en el cas dels diabètics precisament és al contrari: com més jove és el pacient en el moment del diagnòstic de diabetis, més pronunciat és el decrement de la funció renal (83). La barreja dels dos factors fa que aquesta variable no es mantingui de forma significativa als nostres models de regressió.
- 2) Sexe. La bibliografia suggereix una major progressió de la nefropatia en els homes (83, 86). Els nostres resultats coincideixen amb aquest fet.
- 3) Pac(Uri)—Excreció de proteïna; cabal massa(24h). La proteïnúria o l'albuminúria són marcadors de risc de pèrdua progressiva de la funció renal plenament establerts. Zeeuw *et al.* han demostrat que el fet de tenir una excreció basal d'albumina en orina incrementada, multiplica per 8 el risc de progressió de la nefropatia (82). El grau de proteïnúria està correlacionat amb la magnitud de la lesió renal en models experimentals i la seva reducció ajuda a preservar la filtració glomerular (113). Als nostres models, l'augment d'1 g/L d'excreció de proteïna explica aproximadament un augment del 40% del risc de disminuir a la meitat la VFG.
- 4) Velocitat de filtració glomerular basal. S'ha relacionat una progressió més ràpida de la nefropatia en els pacients amb una funció renal més malmesa (83), i així ho hem observat nosaltres, encara que la VFG basal únicament explica un augment d'entre un 2 i un 3% del risc que la nefropatia progressi.
- 5) Tensió arterial sistòlica i diastòlica. En els nostres resultats, la tensió arterial diastòlica no s'ha relacionat amb la progressió de la nefropatia en cap dels models que hem analitzat. En contraposició, la tensió arterial sistòlica ha resultat un predictor de la progressió estadísticament significatiu. Aquesta troballa coincideix amb els resultats presentats per Hadjadj (74) i per Bakris *et al.* (114) de l'estudi RENAAL on es conclou que per cada increment de 10 mmHg de la pressió arterial

sistòlica, el risc d'insuficiència renal crònica terminal o mort augmenta un 6,7%. En els pacients diabètics de tipus 2, la pressió arterial sistòlica és un predictor molt més fort de complicacions renals que no pas la pressió arterial diastòlica (28, 114).

- 6) Hb(San)—Hemoglobina A1c; fr.subst. com a marcador del control de la concentració de glucosa en plasma. La glicosilació de l'hemoglobina en pacients diabètics amb patologia renal és menor que en la resta de pacients. Inaba *et al.* (115) analitzen aquesta problemàtica i proposen avaluar el control de la concentració de la glucosa en sang dels pacients en hemodiàlisi mitjançant l'albumina glicosilada (glicalbumina). Tot i això, els resultats que presentem no es troben afectats per aquest fet perquè comparen únicament pacients diabètics entre sí.
- 7) Srm—Albumina; c.massa i San—Eritròcits; fr.vol.(hematòcrit), com a marcadors de l'estat nutricional. Coincidint amb els nostres resultats, Keane *et al.* van identificar la hipoalbuminèmia i l'anèmia com a predictors de desenvolupament d'insuficiència renal crònica terminal (101-102). Les guies de la National Kidney Foundation també associen la concentració baixa d'albumina en el sèrum amb una major progressió de la malaltia. La correcció de l'anèmia sembla que també podria millorar el curs de la nefropatia (83).
- 8) Srm—Colesterol; c.subst. i Srm—Triglicèrid; c.subst. com a marcadors de dislipèmia i també el tabaquisme com a factor de risc d'ateroesclerosi. La teràpia dirigida a la disminució de la concentració de lípids també sembla que ajuda a disminuir la progressió de la nefropatia, així com el tabaquisme té un efecte perjudicial (83). Cap d'aquestes magnituds s'ha relacionat amb la progressió de la nefropatia a la nostra mostra.
- 9) Tractament farmacològic amb IECA i/o ARA-II. S'ha demostrat que la inhibició de l'enzim convertidor d'angiotensina o el bloqueig del receptor d'angiotensina II són intervencions efectives per reduir la progressió de la nefropatia (83).
- 10) Índex de massa corporal (IMC).

Al nostre treball, disposem del seguiment anual de les següents magnituds: Pac(Uri)—Excreció de proteïna; cabal massa(24h), la tensió arterial sistòlica i la diastòlica, Srm—Colesterol; c.subst. i Hb(San)—Hemoglobina A1c; fr.subst. Pels models de regressió s'ha valorat la inclusió de la seva mesura basal, de la mitjana de totes les mesures recollides i de la integral de la corba que conformen tots els punts o AUC. Per les variables de control resulta altament informatiu saber si entre el punt inicial i el final el pacient ha estat sotmès a unes concentracions de colesterol en el plasma, per exemple, especialment elevades. El càlcul de l'àrea sota la corba i de la

mitjana intenten reflectir aquest fet. Conceptualment és diferent dels criteris per valorar la progressió on només hem pres el punt inicial i el final precisament perquè els punts intermedis són majoritàriament progressius cap al punt final. Per la majoria de les magnituds, l'àrea sota la corba és la que mostra una relació estadísticament més significativa amb la progressió de la nefropatia i aquesta troballa és consistent amb el fet que l'AUC és el càlcul més aproximat del temps real que ha estat cada pacient sotmès a unes determinades concentracions de risc.

Les magnituds que han resultat estadísticament significatives amb la progressió de la nefropatia són el sexe, l'MDRD basal, l'AUC de l'excreció de proteïna en orina de 24 hores, l'hematòcrit i l'AUC de la tensió arterial sistòlica; i només en algun cas: l'edat i Srm—Albúmina; c.massa. Aquests resultats són consistents amb un treball publicat per Keane *et al.* (101) que van estudiar alguns factors de risc independents de progressió de la nefropatia fins a insuficiència renal terminal. Van concloure que l'excreció urinària d'albúmina, la concentració d'hemoglobina i la concentració en el plasma d'albúmina i de creatinina eren clars factors de risc de progressió.

Pel que fa al tractament farmacològic, no s'ha observat que estigui relacionat de forma significativa ni amb la progressió de la nefropatia a la regressió univariant, ni formant interacció amb els genotips (dades no mostrades). Som conscients que el disseny d'aquest estudi impedeix emetre conclusions fermes pel que fa al tractament farmacològic. L'estudi està limitat per la manca d'informació sobre el tractament que els pacients han rebut a l'atenció primària: desconeixem si han rebut tractament previ amb IECA i ARA-II que s'hagués suspès abans de la primera visita a l'especialista, les dosis progressives de la medicació ni els criteris que han obeït els metges per adjudicar el tractament. De totes formes, per estudiar la interacció del tractament farmacològic i els polimorfismes genètics amb objectivitat, cal un estudi aleatori, prospectiu i controlat per totes les variables que poden afectar la progressió, amb un coneixement estricte de les dosis administrades a cada malalt com és el cas de l'estudi RENAAL (30).

### **L'efecte genètic i els al·lels de risc**

El segon objectiu d'aquesta tesi és avaluar si els polimorfismes genètics tenen alguna influència sobre la progressió de la nefropatia en pacients diabètics de tipus 2. Per a això, s'han dut a terme regressions lineals múltiples i regressions de Cox. Hem trobat una relació estadísticament significativa entre la progressió i la combinació formada pels polimorfismes I/D de l'ACE1, p.M235T del gen AGT i c.186+2053G>A de l'ACE2.

Dels models de regressió de Cox independents per a cada polimorfisme, únicament en l'estudi del risc que té un pacient de disminuir a la meitat el seu MDRD, l'al·lel D del polimorfisme I/D de l'ACE1 ha mostrat un efecte estadísticament significatiu sobre la progressió de la nefropatia. En l'estudi del risc que té un pacient de doblar la concentració de creatinina en el plasma, no s'ha trobat cap relació estadísticament significativa amb els polimorfismes. I finalment pel que fa al risc que un pacient passi al següent estadi d'insuficiència renal crònica, s'ha obtingut una relació significativa amb el polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 únicament en les dones. No obstant, considerem aquest efecte sense validesa, donat que només s'observa en les dones amb genotip GG respecte les que tenen genotip CC i quan afegim les dones heterozigotes GC l'efecte es perd completament. Pel que fa a les regressions lineals múltiples efectuades pels quatre criteris d'avaluació de la progressió restants, s'observa una relació estadísticament significativa entre el pendent de disminució d'MDRD i els polimorfismes p.M235T de l'AGT, c.186+2053G>A i c.1542-361C>G de l'ACE2 –els dos darrers únicament en els homes–.

El mateix estudi es va realitzar escollint els pacients que van arribar a la primera consulta de l'especialista amb una velocitat de filtració glomerular superior a 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (és a dir, quedaven fora els que presentaven un MDRD entre 30 i 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>). Amb aquest nou criteri d'inclusió, el nombre d'individus va disminuir fins a 123; hom podria pensar que la disminució de la *n* portaria a una disminució de la significació estadística, però precisament es va trobar l'efecte contrari. El polimorfisme I/D mostra un efecte sobre la diferència anual relativa d'MDRD i de creatinina. El polimorfisme p.M235T es troba fortament relacionat amb la progressió amb tots quatre criteris. El polimorfisme c.186+2053G>A en els homes mostra un efecte sobre la diferència anual relativa d'MDRD i de creatinina i sobre el pendent d'MDRD, mentre que el polimorfisme c.1542-361C>G en els homes està relacionat de forma significativa únicament amb el pendent d'MDRD. A la vista d'aquests resultats, podem afirmar que l'efecte genètic s'observa millor en els pacients que arriben a la consulta del nefròleg amb una filtració glomerular encara conservada. Probablement les complicacions pròpies de la insuficiència renal crònica emmascaren l'efecte que tenen els polimorfismes quan aquesta progressa cap a estadis superiors. No hem d'oblidar que ens trobem davant d'una malaltia molt complexa on intervien tant determinants genètics com ambientals, i és poc probable trobar associacions individuals molt fortes amb la progressió de la nefropatia.



Respecte als al·lels que confereixen risc de progressió de la nefropatia hi ha una coincidència absoluta amb tots 7 criteris estudiats. Els al·lels de risc de progressió són: **D** del polimorfisme I/D del gen *ACE1*, **M** del polimorfisme p.M235T del gen *AGT*, **A** del polimorfisme c.186+2053G>A i **G** del polimorfisme c.1542-361C>G del gen *ACE2*. Els altres dos polimorfismes estudiats (g.1166A>C del gen *AGTR1* i c.439+4C>T del gen *ACE2*) no presenten cap relació amb la progressió.

### **Coherència dels resultats dels diversos criteris per avaluar la progressió**

Tot i que és esperable que hi hagi un cert grau de coherència entre tots els resultats, no disposem d'eines estadístiques que ens permetin assegurar quin dels 7 criteris que hem emprat estima millor la progressió de la nefropatia. Per altra banda, de les variables de control que s'han contemplat, la proteïnúria és la que està més fortament relacionada amb la progressió de la nefropatia cap a insuficiència renal terminal (82, 102). Els resultats que hem presentat coincideixen a subratllar aquest fet. Pensem que un criteri per escollir el càlcul que millor avalua la progressió podria ser aquell per al qual en l'estudi de regressió es produeix una relació més estreta entre la variable Pac(Uri)—Excreció de proteïna; cabal massa(24h) i la progressió. Si seguim aquest plantejament, trobem que ambdues variables presenten la relació estadísticament més significativa quan es valora la progressió mitjançant el pendent d'MDRD ( $p=5,0 \times 10^{-44}$ ), superior inclús als models de regressió de Cox.

Tal com està dissenyat el present estudi, els criteris que avaluen el risc mitjançant regressions de Cox tenen una limitació que les regressions lineals no tenen: no disposem de la data exacta en la qual té lloc l'esdeveniment estudiat, ja sigui el moment en el qual es dobla la concentració de creatinina basal, es disminueix a la meitat l'MDRD o bé es canvia d'estadi d'insuficiència renal. Els pacients tenen un seguiment anual per part del nefròleg i en el temps intermedi no disposem de cap informació. Aquesta limitació que distorsiona els temps recollits pot explicar en part la manca de significació estadística tant en l'estudi incloent únicament els pacients amb filtració glomerular conservada, com amb les combinacions dels al·lels.

### **Comparació amb la bibliografia**

Dels estudis genètics que avaluen la progressió de la nefropatia en el pacient diabètic, el polimorfisme I/D de l'*ACE1* és el més àmpliament investigat. Encara que molts estudis han aportat evidències que l'al·lel D confereix risc al desenvolupament i progressió de la nefropatia diabètica, també han estat publicats alguns resultats conflictius encara que poc nombrosos (116, 117). S'han dut a terme una gran quantitat d'estudis buscant gens candidats, però fins al moment, el gen *ACE1* és l'únic ben

caracteritzat que roman associat amb la patogènesi i progressió de la malaltia renal crònica. El genotip II és protector contra el desenvolupament i progressió de nefropatia diabètica (36, 74). En un estudi amb 3126 pacients de raça blanca, es va demostrar que aquest polimorfisme prediu la probabilitat dels pacients diabètics de tipus 2 de desenvolupar insuficiència renal crònica terminal (74).

Tien *et al.* (75) van dur a terme un estudi prospectiu observacional amb 525 pacients diabètics de tipus 2 taiwanesos. Van concloure que l'al·lel D conferia risc de progressió de la nefropatia únicament en les dones, mentre que no van trobar cap relació ni amb homes ni amb dones pel que fa al polimorfisme p.M235T. Coll *et al.* (117) van estudiar, en una població molt semblant a la nostra, el temps que van trigar 104 pacients a arribar a insuficiència renal crònica terminal. Al contrari que nosaltres, no van trobar diferències pel que fa al polimorfisme I/D ni p.M235T, i en canvi sí que en van trobar pel polimorfisme g.1166A>C. Adjudiquem aquestes discordances a la diferent selecció de pacients, donat que únicament van incloure els de pitjor pronòstic, que ja estaven en tractament renal substitutiu.

Pel que fa a l'expressió gènica, en un estudi recent es va comparar l'expressió de diversos gens del sistema renina-angiotensina (entre els quals es trobaven els quatre estudiats en el nostre treball) i van veure que l'expressió gènica de l'*ACE1* era l'única que estava augmentada en pacients diabètics amb nefropatia respecte altres pacients no diabètics també amb nefropatia (118).

En canvi, respecte als polimorfismes p.M235T del gen *AGT* i g.1166A>C del gen *AGTR1*, tot i haver estat també extensament estudiats, existeix força contradicció entre els resultats publicats.

El genotip TT del polimorfisme del gen *AGT*, va ser inicialment relacionat amb risc d'hipertensió (70) i risc de progressió de la nefropatia. En canvi, Jacobsen *et al.* (73) han identificat un efecte combinat entre els al·lells D (*ACE1*), M (*AGT*) i A (*AGTR1*) en la progressió de la nefropatia en un estudi amb 169 diabètics de tipus 1. La divergència respecte als nostres resultats pel que fa al polimorfisme g.1166A>C probablement és deguda a que no van considerar l'establiment d'un criteri previ de selecció dels al·lells de risc. Pel que fa al polimorfisme de l'*AGT*, aquests resultats són consistents amb els presentats per Osawa (72), el qual demostra que l'al·lel M està relacionat amb concentracions clarament més elevades d'mRNA de l'angiotensinogen al ronyó de pacients sans. Lovati *et al.* (86) troben un efecte més gran del polimorfisme I/D de l'*ACE1* sobre la progressió de nefropatia en presència del genotip MM (*AGT*). Aquests fets coincideixen a corroborar els resultats presentats en aquesta tesi on hem considerat que l'al·lel M confereix un pitjor pronòstic.

La majoria de treballs publicats sobre el polimorfisme g.1166A>C de l'AGTR1 no han aconseguit confirmar la possible associació amb la progressió. Tal i com ja s'ha comentat, Osawa no troba cap relació amb la nefropatia, mentre que Jacobsen documenta l'existència d'un efecte combinat entre l'ACE1, l'AGT i l'AGTR1. Yoshida *et al.* (76) van fer un estudi de seguiment de 10 anys incloent 168 pacients diabètics de tipus 2 i van dividir els pacients en dos grups en funció de si al final de l'estudi la nefropatia havia progressat lleument o bé greument –fins a diàlisi–. Van relacionar els dos grups amb el genotip dels polimorfismes: I/D de l'ACE1, p.M235T de l'AGT i g.1166A>C de l'AGTR1. No van observar diferències en la freqüència genotípica dels dos darrers polimorfismes, però sí que van objectivar un efecte del primer dels polimorfismes: en els pacients amb decrement de la funció renal, aquells amb genotip DD presentaven un temps des de l'inici de la diabetis fins a l'inici de diàlisi significativament més curt que els portadors de l'al·lel I. De la mateixa manera, Hadjadj *et al.* tampoc no van trobar cap relació entre els esdeveniments renals i el polimorfisme p.M235T (74) en un estudi amb 310 pacients diabètics de tipus 1.

Els polimorfismes de l'ACE2 no havien estat mai estudiats en la progressió de la nefropatia.

De les discrepàncies que existeixen entre els diversos estudis, és evident que els polimorfismes del RAS no són marcadors simples de malaltia renal.

### Conclusions principals

Tornant als resultats presentats en aquest treball, les combinacions dels al·lells de risc estadísticament més significatives són les relacionades amb el pendent de l'MDRD. La combinació que estima amb més precisió la progressió de la nefropatia està formada pels al·lells **D** (I/D), **M** (p.M235T) i **A** (c.186+2053G>A) en els pacients amb la velocitat de filtració glomerular conservada. Per cada al·lel de risc addicional, el pendent d'MDRD varia -0,86 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> cada any ( $p=0,0005$ ). Tenir els 6 al·lells de risc respecte no tenir-ne cap, explica una variació anual del pendent d'MDRD de -5,2 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>.

De mitjana, un individu amb un MDRD de 65 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> trigaria a arribar a estadi d'insuficiència renal crònica terminal (MDRD < 15 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) menys de 10 anys si té els sis al·lells de risc, i probablement no hi arribaria mai si no en té cap.

L'avaluació de la interacció genètica mitjançant la suma dels al·lells de risc va ser introduïda per Jacobsen *et al.* (73). Aquest criteri té dues limitacions i és que assumeix que cada polimorfisme té el mateix pes sobre l'efecte de la progressió de la nefropatia i a més a més, pels polimorfismes que es troben al cromosoma X els homes s'han

hagut de considerar homozigots amb dues aportacions al·lèliques per poder-los sumar a la resta de la població. Per poder combinar 6 polimorfismes, s'ha de tenir un nombre suficient de pacients dins de cada possible combinació de genotips, i amb 320 pacients no ha estat possible. Donada aquesta dificultat, el criteri utilitzat per Jacobsen *et al.* pot ser una bona aproximació.

El polimorfisme c.1542-361C>G del gen *ACE2* no sembla tenir un paper destacat en la progressió de la nefropatia; quan s'inclou a les combinacions d'al·lèls de risc, l'efecte màxim que s'explica per la genètica disminueix lleugerament. No obstant, el fet que per una banda existeixi una relació estadísticament significativa amb el pendent d'MDRD i per una altra compleixi els criteris d'inclusió per l'estudi combinat dels al·lèls en quatre de les set avaluacions de la progressió, sembla indicar certa influència sobre la progressió de la insuficiència renal crònica, encara que inferior al polimorfisme c.186+2053G>A.

### **Anotacions finals de l'estudi de la progressió**

Per concloure la discussió de l'estudi de la influència genètica en la progressió de la nefropatia, voldríem afegir els dos comentaris següents:

En primer lloc, sorprèn la manca de reproductibilitat en el grup de dones dels resultats obtinguts pels polimorfismes del gen *ACE2* en els homes. No és que presentin efectes contraris, sinó que a les dones no s'observa cap efecte sobre la progressió de la nefropatia. Aquest fenomen ja el trobàvem a l'estudi de la mortalitat dels pacients diabètics de tipus 2 en diàlisi. De fet, a algunes de les regressions individuals, el sexe apareix com a variable de control estadísticament significativa; concretament ser dona protegeix de la progressió de la nefropatia, i aquesta troballa és consistent amb la bibliografia disponible (83, 86). Com que la progressió és menor en les dones, podria ocasionar que costés més observar l'efecte genètic. No hem d'oblidar que el gen es troba al cromosoma X; ja hem apuntat anteriorment que la diferent aportació genotípica juntament amb la *n* podrien ser-ne, en part, la causa. El fet que els efectes dels polimorfismes genètics sobre la progressió de la nefropatia depenguin del sexe ja s'ha descrit prèviament (72, 75). Tot i que l'estudi de la influència del sexe en l'efecte genètic no era un dels objectius d'aquesta tesi, hem fet una anàlisi de regressió múltiple separant sexes pels altres dos polimorfismes (*ACE1* i *AGT*) i no hem obtingut resultats que facin pensar que l'efecte genètic només s'observi en un dels dos sexes (dades no mostrades).

En segon lloc, per tancar la discussió d'aquest apartat, resulta interessant assenyalar que s'ha observat una manca de coherència en l'efecte d'homozigots i heterozigots en força regressions. És esperable que l'efecte dels homozigots per a al·lèls considerats

de risc sigui major al dels heterozigots, però en la majoria de casos, aquesta gradació no s'ha donat. Aquest fenomen s'ha observat també en els resultats presentats per altres autors on també estudien algun dels polimorfismes que hem inclòs en el treball (52, 76). De totes formes, els efectes d'homozigots per a l'al·lel de risc i heterozigots són similars.

### **ESTUDI DE LA SUSCEPTIBILITAT A DESENVOLUPAR NEFROPATIA**

Aquesta tesi presenta també els resultats obtinguts en un estudi preliminar que s'ocupa de valorar la influència dels polimorfismes genètics sobre la susceptibilitat que tenen els pacients diabètics de tipus 2 a desenvolupar nefropatia.

Es tracta d'un estudi de casos control: és un disseny epidemiològic no experimental –basat en l'observació– on la població de diabètics de tipus 2 s'ha seleccionat per l'efecte final: tenir nefropatia –casos– o no tenir-ne –controls–. Ambdós grups provenen de la mateixa població de pacients diabètics de tipus 2 que busquen assistència al mateix centre hospitalari. Per tant es compleix el principi fonamental d'aquest tipus d'estudis on els controls han de representar la població en la que s'originen els casos.

Com a controls s'han inclòs 69 pacients diabètics de tipus 2 que no presentaven signes de nefropatia. I com a casos s'ha incorporat una selecció de 227 pacients diabètics de tipus 2 amb nefropatia establerta que tinguessin la mateixa distribució d'edat i sexe que el grup de controls.

S'han inclòs les mateixes variables de control que vam emprar per l'estudi de la progressió de la nefropatia, sempre que la informació disponible de les històries clíniques ho ha permès: tensió arterial sistòlica i diastòlica, tabaquisme, índex de massa corporal, S<sub>rm</sub>—Albúmina; c.massa, S<sub>an</sub>—Eritròcits; fr.vol.(hematòcrit), Hb(S<sub>an</sub>)—Hemoglobina A1c; fr.subst. i S<sub>rm</sub>—Colesterol; c.subst.

No s'ha observat que els polimorfismes estudiats tinguin cap relació amb la susceptibilitat a desenvolupar nefropatia en els pacients diabètics de tipus 2.

Som conscients que el disseny d'aquest treball no permet emetre conclusions fermes al respecte i per això hem expressat en tot moment que es tracta d'un estudi preliminar. En un estudi de casos-controls, el nombre de controls ha de ser com a mínim similar al de casos, i aquesta proporció no es compleix amb el nostre disseny. La principal limitació de l'estudi rau precisament en la dificultat que hem tingut per augmentar la quantitat de controls. Els controls ideals serien aquells pacients diabètics de tipus 2 que es visiten a centres d'atenció primària de la mateixa àrea perquè no presenten complicacions derivades de la malaltia, i per tant no estan controlats pels especialistes de l'hospital. Cal dir que inicialment vam realitzar aquest estudi mantenint

el mateix nombre de casos que de controls (és a dir, 69 pacients en cada grup) però no vam obtenir efectes estadísticament significatius dels polimorfismes sobre la susceptibilitat a desenvolupar nefropatia. Vam pensar que la  $n$  era massa petita i vam ampliar-la però únicament dels casos, perquè no disposem de més controls.

Per millorar el disseny d'aquest estudi hauríem de treballar conjuntament amb els centres d'atenció primària per reclutar més controls.

### **Comparació amb la bibliografia**

Ahluwalia *et al.* (80) han desenvolupat un estudi de casos-controls per avaluar la relació entre 7 variants de polimorfismes del RAS i la susceptibilitat a desenvolupar nefropatia en 440 pacients diabètics de tipus 2 originaris del sud-est asiàtic. Troben un risc més alt de nefropatia en els pacients amb al·lels D (I/D de l'*ACE1*), T (p.M235T de l'*AGT*) i C (g.1166A>C de l'*AGTR1*) que s'incrementa si es troben en interacció.

Osawa *et al.* (72) van dur a terme un estudi amb 747 casos de nefropatia i 557 controls tots ells diabètics de tipus 2 provinents del Japó i van buscar l'associació amb diversos polimorfismes de gens del RAS així com també l'expressió gènica de l'*AGT* en funció del polimorfisme p.M235T. Van concloure que l'al·lel D del polimorfisme I/D i l'al·lel M del p.M235T conferien susceptibilitat a nefropatia diabètica, especialment en les dones. Contràriament, no van observar cap relació amb el polimorfisme g.1166A>C. Van concloure, també, que la interacció entre diversos polimorfismes no és sinèrgica però sí additiva. I finalment van demostrar que en pacients sans, l'al·lel M del polimorfisme p.M235T està associat a una major expressió de l'enzim en teixit renal. L'efecte del genotip DD sobre el risc de desenvolupar nefropatia en les dones també s'ha documentat en altres articles (119). Un metanàlisi que inclou 14727 individus va mostrar que els diabètics amb genotip II tenien un 22% de risc menys de desenvolupar nefropatia diabètica que no pas els portadors de l'al·lel D (120). I finalment, un estudi amb un total de 69 pacients diabètics de raça blanca, va trobar una major prevalença del genotip TT (*AGT*) entre els casos (malaltia renal terminal) que entre els controls (86).

El risc de desenvolupar nefropatia diabètica ha estat estudiat també en els pacients diabètics de tipus 1. Hadjadj *et al.* (74) van trobar relació entre l'al·lel D i l'establiment de nefropatia, però no van poder demostrar cap efecte del polimorfisme p.M235T. Van trobar una associació entre el sexe masculí i el desenvolupament de nefropatia, així com també nosaltres observem un pitjor pronòstic en els homes quant a progressió de la malaltia. Pel que fa al polimorfisme g.1166A>G, els homozigots AA tenen un risc superior de desenvolupar la nefropatia, el qual està incrementat en els fumadors (52).

Pel que fa als polimorfismes de l'ACE2, Frojdo *et al.* (68) han realitzat un estudi amb 365 casos i 458 controls, tots ells diabètics de tipus 1 finlandesos, intentant relacionar la susceptibilitat a patir nefropatia amb alguns polimorfismes, entre ells el c.439+4C>T i el c.1542-361C>G, i no han trobat cap associació estadísticament significativa.

### Resum i comentari final

En resum, els resultats del present treball posen de manifest que els polimorfismes I/D del gen ACE1, p.M235T de l'AGT, c.186+2053G>A i en menor importància c.1542-361C>G del gen ACE2 influeixen en la mortalitat dels pacients diabètics de tipus 2 en diàlisi i en la progressió de la nefropatia una vegada ja està establerta, i que els polimorfismes implicats actuen conjuntament per produir l'efecte final. Per contra, no hem pogut demostrar que estiguin relacionats en la susceptibilitat a desenvolupar la nefropatia.

Els al·lels que confereixen risc de mortalitat en diàlisi són el **D** (ACE1), **M** (AGT) i **G** (c.186+2053), mentre que els al·lels que confereixen susceptibilitat en la progressió de la nefropatia són el **D** (ACE1), **M** (AGT) i **A** (c.186+2053). És notori el fet que l'al·lel de risc de mortalitat del polimorfisme c.186+2053 de l'ACE2 no es correspongui amb l'al·lel de risc de progressió. A més a més, l'al·lel de risc de l'altre polimorfisme de l'ACE2 que mostra també un cert efecte – c.1542-361C>G –, tampoc no coincideix: per a la mortalitat és el C, mentre que per la progressió és el G. Davant del que sembla una incongruència, hem de dir que els resultats dels dos estudis no tenen per què coincidir ja que s'avaluen esdeveniments completament diferents. El polimorfisme que en un inici pot ser protector per a un fenomen, pot ser que posteriorment sigui desencadenant d'un altre fenomen. És evident que manca per conèixer amb molta més profunditat la funció de l'enzim convertidor d'angiotensina II de tipus 2 i l'efecte concret que provoquen els polimorfismes del seu gen per entendre el paper exacte que juga en les complicacions dels pacients diabètics de tipus 2. De totes formes, la seva implicació en la mortalitat i en la progressió ja sigui de forma directa o indirecta – reflectint l'efecte d'un altre polimorfisme de l'haplotip – és un fet.





## **6. CONCLUSIONS**



---

**Estudi de la influència genètica sobre la mortalitat en diàlisi de pacients diabètics de tipus 2:**

1. Dels polimorfismes del RAS estudiats individualment, únicament l'I/D (*ACE1*), i el p.M235T (*AGT*) presenten efectes estadísticament significatius sobre la mortalitat.
2. Els resultats d'aquesta tesi suggereixen que els polimorfismes I/D (*ACE1*), p.M235T (*AGT*), c.186+2053G>A, i c.1542-361C>G (*ACE2*) combinats entre ells, tenen un paper significatiu en el risc de mortalitat, i que els al·lels que confereixen aquest risc són D, M, G i C, respectivament.
3. La combinació de polimorfismes que millor estima el risc de morir és la formada per I/D, p.M235T i c.186+2053G>A. El risc relatiu de morir es multiplica per 1,5 ( $p=0,002$ ) per cada al·lel de risc addicional, de forma que els pacients amb els sis al·lels tenen un risc de morir 11 vegades més alt que els pacients que no tenen cap al·lel de risc. La corba de supervivència coincideix a assenyalar aquest fet.
4. Els polimorfismes g.1166A>C (*AGTR1*) i c.439+4C>T (*ACE2*) no semblen estar relacionats amb la mortalitat dels pacients estudiats.

**Estudi de la influència genètica sobre la progressió de la nefropatia en pacients diabètics de tipus 2:**

5. Els diversos criteris emprats per avaluar la progressió de la nefropatia han aportat resultats coherents, encara que amb diferent significació estadística. Proposem l'ús del pendent de l'MDRD per ser el que ha mostrat una relació més intensa amb l'excreció diària de proteïna en orina, la magnitud que bibliogràficament més s'ha relacionat amb la progressió.
6. Quan s'estudien de forma individual, s'ha observat un efecte estadísticament significatiu dels polimorfismes p.M235T (*AGT*), c.186+2053G>A i c.1542-361C>G (*ACE2*) –els dos darrers únicament en els homes– sobre el pendent de la velocitat de filtració glomerular.
7. La combinació dels polimorfismes I/D (*ACE1*), p.M235T (*AGT*), c.186+2053G>A, i c.1542-361C>G (*ACE2*) influeixen en la progressió de la nefropatia en pacients diabètics de tipus 2. Aquest efecte és més evident en els pacients amb una VFG conservada a la primera visita al centre hospitalari, i especialment en els homes.

8. La combinació de polimorfismes que millor estima el risc de progressió de la nefropatia és la formada per l'I/D, el p.M235T i el c.186+2053G>A. En els pacients amb VFG conservada, per cada al·lel de risc addicional –D, M i A, respectivament– el pendent d'MDRD varia -0,86 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> anualment ( $p=0,0005$ ). És a dir, el fet de tenir els 6 al·lells de risc respecte no tenir-ne cap, explica una pèrdua anual de la VFG de -5,2 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>.
9. Els polimorfismes g.1166A>C (*AGTR1*) i c.439+4C>T (*ACE2*) no semblen estar relacionats amb la progressió de la nefropatia dels pacients estudiats.

**Estudi de la influència genètica sobre la instauració de la nefropatia en pacients diabètics de tipus 2:**

10. Amb el disseny realitzat en aquesta tesi, no hem pogut evidenciar cap efecte genètic en la instauració de la nefropatia.

## **7. ANNEX**



## A. Fórmula del decrement relatiu anual de la VFG

L'objectiu és trobar un únic valor en percentatge que il·lustri la disminució de la velocitat de filtració glomerular cada any.

Per cada individu partim d'una velocitat de filtració glomerular basal (**MDRD<sub>B</sub>**), uns anys de seguiment (**x**) i una diferència relativa percentual anual de la velocitat de filtració glomerular (dif relat anual, **d**).

Quan hagi transcorregut un any, la filtració glomerular serà MDRD<sub>B+1</sub> i es pot expressar com:

$$MDRD_{B+1} = MDRD_B + \frac{d \times MDRD_B}{100} = MDRD_B \left(1 + \frac{d}{100}\right)$$

Quan hagin transcorregut dos anys, la filtració glomerular serà MDRD<sub>B+2</sub> i es pot expressar com:

$$MDRD_{B+2} = MDRD_B \left(1 + \frac{d}{100}\right) + MDRD_B \left(1 + \frac{d}{100}\right) \times \frac{d}{100}$$

traient factor comú:

$$MDRD_{B+2} = MDRD_B \left(1 + \frac{d}{100}\right) \times \left(1 + \frac{d}{100}\right) = MDRD_B \left(1 + \frac{d}{100}\right)^2$$

Així doncs, de forma general, quan hagin transcorregut tots els x anys de seguiment, la filtració glomerular serà MDRD<sub>B+x</sub> = **MDRD<sub>F</sub>** i es pot expressar com:

$$MDRD_F = MDRD_B \left(1 + \frac{d}{100}\right)^x$$

Aïllant d, que és el que estem buscant, obtenim:

$$\frac{MDRD_F}{MDRD_B} = \left(1 + \frac{d}{100}\right)^x$$

$$\left(\frac{MDRD_F}{MDRD_B}\right)^{1/x} = \left(1 + \frac{d}{100}\right)$$

$$dif \text{ relat anual } (d) = \left[ \left( \frac{MDRD_F}{MDRD_B} \right)^{\frac{1}{\text{anys seguiment } (x)}} - 1 \right] \times 100$$

## **B. Regressions lineals múltiples mesurant la progressió de la nefropatia amb la concentració de creatinini en el plasma**

Es segueix el mateix esquema desenvolupat per als altres criteris d'avaluació de la progressió de la nefropatia que tenen en compte la velocitat de filtració glomerular estimada (apartat 4.1.3.2).

A les *taules 52-69* es troben resumides les regressions per a cada polimorfisme i per cada un dels dos criteris que empren el Srm—Creatinini: la diferència relativa i el pendent anual. A les mateixes taules es poden consultar també les regressions del subgrup de pacients que van arribar a la primera consulta al nefròleg amb una velocitat de filtració glomerular  $\geq 60$  mL/min/m<sup>2</sup>.

Pel que fa als polimorfismes de l'*ACE2*, només hi ha 37 dones amb MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>. Aquest nombre és insuficient per dur a terme regressions lineals múltiples perquè podria estar produint distorsions en els coeficients de regressió: només hi ha 5 dones amb genotip AA pel polimorfisme c.186+2053G>A, 2 dones amb genotip TT pel polimorfisme c.439+4C>T i 7 dones amb genotip GG pel polimorfisme c.1542-361C>G. Per això s'han agrupat les portadores dels al·lels A, T i G, respectivament.

S'observen resultats similars als obtinguts pels altres criteris presentats a l'apartat de resultats 4.2.2: de tots els polimorfismes estudiats, l'I/D de l'*ACE1* i el p.M235T de l'*AGT* mostren un efecte significatiu sobre la progressió de la malaltia en el grup de pacients que arriben al Servei de Nefrologia amb una velocitat de filtració glomerular conservada. En aquest grup de pacients, quan valorem l'efecte de l'al·lel que indueix una major progressió respecte el genotip que protegeix, observem que pel que fa al polimorfisme I/D, els pacients portadors de l'al·lel D respecte als que tenen genotip II, presenten un augment anual de la concentració de creatinini en el plasma de 8,1 mmol/L més (0,2-16,0;  $p=0,045$ ), que representa un increment anual de 3,6 unitats de percentatge addicional (0,3-6,8;  $p=0,032$ ). D'altra banda, pel que fa al polimorfisme p.M235T, els pacients portadors de l'al·lel M respecte als que tenen genotip TT, presenten un augment anual de la concentració de creatinini en el plasma de 8,5 mmol/L més (0,9-16,1;  $p=0,028$ ), que representa un increment percentual anual de 4,1 addicional (1,0-7,2;  $p=0,011$ ).



**Polimorfisme I/D del gen ACE1**

Variables de la regressió	Model 1 (n=320)		Model 2 (n=123)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
ACE 1 (DD vs II)	1,1 (-3,4 a 5,6)	0,633	2,9 (-0,7 a 6,4)	0,111
ACE 1 (ID vs II)	1,6 (-2,8 a 5,9)	0,488	4,2 (0,7 a 7,8)	0,019
Srm—Creatinini basal	0,07 (0,01 a 0,13)	0,017	-	-
Hematòcrit (%)	-	-	-0,4 (-0,7 a -0,1)	0,019
Excreció de proteïna AUC	4,3 (3,3 a 5,2)	$1,3 \times 10^{-17}$	5,3 (4,3 a 6,4)	$9,4 \times 10^{-18}$
Tensió arterial sistòlica AUC	0,11 (0,02 a 0,20)	0,021	-	-

**Taula 52.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model 1 (amb tots els pacients) i el model 2 (només amb els pacients amb MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme I/D del gen ACE1 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la **diferència anual relativa de creatinini**.

Variables de la regressió	Model 1 (n=320)		Model 2 (n=123)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
ACE 1 (DD vs II)	3,1 (-9,6 a 15,9)	0,629	7,6 (-1,0 a 16,3)	0,083
ACE 1 (ID vs II)	7,9 (-4,6 a 20,4)	0,216	8,5 (-0,1 a 17,1)	0,052
Edat	-0,5 (-1,0 a -0,03)	0,038	-	-
Srm—Creatinini basal	0,27 (0,10 a 0,43)	0,001	-	-
Excreció de proteïna mitjana	15,7 (13,0 a 18,3)	$2,2 \times 10^{-26}$	10,3 (7,9 a 12,8)	$2,0 \times 10^{-13}$

**Taula 53.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model 1 (amb tots els pacients) i el model 2 (només amb els pacients amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme I/D del gen ACE1 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant el **pendent de creatinini**.

**Polimorfisme p.M235T del gen AGT**

Variables de la regressió	Model 1 (n=320)		Model 2 (n=123)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
AGT (MM vs TT)	2,7 (-1,8 a 7,3)	0,241	3,2 (-0,2 a 6,8)	0,068
AGT (MT vs TT)	3,1 (-1,2 a 7,4)	0,165	4,6 (1,3 a 7,9)	0,007
Srm—Creatinini basal	0,07 (0,01 a 0,13)	0,021	-	-
Hematòcrit (%)	-	-	-0,4 (-0,7 a -0,1)	0,018
Excreció de proteïna AUC	4,2 (3,3 a 5,1)	$6,3 \times 10^{-17}$	5,2 (4,2 a 6,3)	$2,7 \times 10^{-17}$
Tensió arterial sistòlica AUC	0,12 (0,02 a 0,21)	0,019	-	-

**Taula 54.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística de les variables del model 1 (amb tots els pacients) i el model 2 (només amb els pacients amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme p.M235T del gen AGT sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant el **diferència relativa de creatinini**.

Variables de la regressió	Model 1 (n=320)		Model 2 (n=123)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>AGT (MM vs TT)</b>	6,3 (-6,7 a 19,3)	0,343	6,6 (-2,1 a 15,2)	0,135
<b>AGT (MT vs TT)</b>	6,6 (-5,7 a 18,8)	0,293	9,8 (1,7 a 17,9)	0,018
Edat	-0,5 (-1,1 a -0,04)	0,034	-0,3 (-0,7 a -0,00)	0,047
Srm—Creatinini basal	0,27 (0,10 a 0,43)	0,001	-	-
Excreció de proteïna mitjana	15,6 (12,9 a 18,2)	$1,7 \times 10^{-23}$	10,3 (7,8 a 12,7)	$2,4 \times 10^{-13}$

**Taula 55** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística de les variables del model 1 (amb tots els pacients) i el model 2 (només amb els pacients amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme p.M235T del gen AGT sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant el **pendent de creatinini**.

### **Polimorfisme g.1166A>C del gen AGTR1**

Variables de la regressió	Model 1 (n=320)		Model 2 (n=123)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>AGTR1 (CC vs AA)</b>	3,8 (-3,0 a 10,6)	0,270	-1,5 (-8,1 a 5,1)	0,658
<b>AGTR1 (AC vs AA)</b>	-0,9 (-4,2 a 2,5)	0,608	1,6 (-1,1 a 4,2)	0,242
Srm—Creatinini basal	0,07 (0,01 a 0,13)	0,023	-	-
Hematòcrit (%)	-	-	-0,3 (-0,6 a -0,01)	0,042
Excreció de proteïna AUC	4,3 (3,3 a 5,2)	$2,4 \times 10^{-17}$	5,3 (4,2 a 6,4)	$6,5 \times 10^{-17}$
Tensió arterial sistòlica AUC	0,11 (0,02 a 0,21)	0,024	-	-

**Taula 56.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model 1 (amb tots els pacients) i el model 2 (només amb els pacients amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme g.1166A>C del gen AGTR1 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la **diferència anual relativa de creatinini**.

Variables de la regressió	Model 1 (n=320)		Model 2 (n=123)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>AGTR1 (CC vs AA)</b>	6,4 (-12,8 a 25,6)	0,514	-2,7 (-18,8 a 13,4)	0,740
<b>AGTR1 (AC vs AA)</b>	-1,6 (-11,1 a 7,9)	0,737	3,9 (-2,5 a 10,3)	0,227
Edat	-0,5 (-1,0 a -0,04)	0,036	-	-
Srm—Creatinini basal	0,27 (0,10 a 0,43)	0,002	-	-
Excreció de proteïna mitjana	15,7 (13,0 a 18,4)	$9,3 \times 10^{-26}$	10,4 (7,9 a 12,9)	$3,4 \times 10^{-13}$

**Taula 57.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística de les variables del model 1 (amb tots els pacients) i el model 2 (només amb els pacients amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme g.1166A>C del gen AGTR1 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant el **pendent de creatinini**.

**Polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 en homes**

Variables de la regressió	Model 1 (n=204)		Model 2 (n=86)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>c.186+2053G&gt;A (A vs G)</b>	1,1 (-1,8 a 4,1)	0,445	3,5 (0,3 a 6,7)	0,032
Hematòcrit (%)	-0,4 (-0,7 a -0,2)	0,002	-	-
Excreció de proteïna AUC	4,0 (3,0 a 5,0)	$3,5 \times 10^{-14}$	4,4 (3,2 a 5,5)	$5,0 \times 10^{-11}$
Tensió arterial sistòlica AUC	0,09 (0,01 a 0,18)	0,036	-	-

**Taula 58.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model 1 (amb tots els homes) i el model 2 (només amb els homes amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la **diferència anual relativa de creatinini**.

Variables de la regressió	Model 1 (n=204)		Model 2 (n=86)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>c.186+2053G&gt;A (A vs G)</b>	2,7 (-5,7 a 11,2)	0,526	3,7 (-4,3 a 11,7)	0,358
Edat	-	-	-0,5 (-0,9 a -0,1)	0,017
Srm—Creatinini basal	0,19 (0,05 a 0,33)	0,008	0,39 (0,05 a 0,73)	0,025
Hematòcrit (%)	-1,0 (-1,8 a -0,2)	0,011	-	-
Srm—Colesterol AUC	4,9 (0,4 a 9,5)	0,035	-	-
Excreció de proteïna mitjana	9,7 (7,0 a 12,5)	$7,8 \times 10^{-11}$	7,9 (5,1 a 10,6)	$2,7 \times 10^{-7}$
Tensió arterial sistòlica AUC	0,4 (0,1 a 0,6)	0,006	-	-

**Taula 59.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model del model 1 (amb tots els homes) i el model 2 (només amb els homes amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant el **pendent de creatinini**.

**Polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 en dones**

Variables de la regressió	Model 1 (n=116)		Model 2 (n=37)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>c.186+2053G&gt;A (AA vs GG)</b>	1,0 (-11,7 a 13,7)	0,875	<b>A vs GG:</b> 1,9 (-5,7 a 9,6)	0,378
<b>c.186+2053G&gt;A (AG vs GG)</b>	2,2 (-6,0 a 10,4)	0,597		
Srm—Creatinini basal	0,24 (0,08 a 0,40)	0,004	0,24 (0,09 a 0,40)	0,003
Excreció de proteïna AUC	5,4 (3,5 a 7,3)	$1,5 \times 10^{-7}$	5,4 (3,5 a 7,3)	$1,3 \times 10^{-7}$

**Taula 60.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model 1 (amb totes les dones) i el model 2 (només amb les dones amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la **diferència anual relativa de creatinini**.

Variables de la regressió	Model 1 (n=116)		Model 2 (n=27)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>c.186+2053G&gt;A</b> (AA vs GG)	-3,0 (-36,8 a 30,7)	0,858	<b>A vs GG:</b> -0,0 (-20,5 a 20,4)	0,998
<b>c.186+2053G&gt;A</b> (AG vs GG)	0,8 (-21,1 a 22,7)	0,941		
Srm—Creatinini basal	0,7 (0,3 a 1,1)	0,002	0,69 (0,27 a 1,1)	0,002
Srm—Albúmina	-	-	3,0 (0,4 a 5,6)	0,025
Excreció de proteïna mitjana	23,5 (18,3 a 28,6)	$1,4 \times 10^{-14}$	23,4 (18,4 a 28,5)	$1,0 \times 10^{-14}$

**Taula 61.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del 1 (amb totes les dones) i el model 2 (només amb les dones amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant el **pendent de creatinini**.

### Polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2 en homes

Variables de la regressió	Model 1 (n=204)		Model 2 (n=86)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>c.439+4C&gt;T (C vs T)</b>	-0,1 (-3,7 a 3,5)	0,942	-0,4 (-3,7 a 2,9)	0,804
Hematòcrit (%)	-0,4 (-0,7 a -0,1)	0,004	-	-
Excreció de proteïna AUC	3,7 (2,8 a 4,7)	$2,3 \times 10^{-13}$	4,3 (3,2 a 5,5)	$1,6 \times 10^{-10}$
Tensió arterial sistòlica AUC	0,10 (0,01 a 0,19)	0,027	-	-

**Taula 62.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model del model 1 (amb tots els homes) i el model 2 (només amb els homes amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la **diferència anual relativa de creatinini**.

Variables de la regressió	Model 1 (n=204)		Model 2 (n=86)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>c.439+4C&gt;T (C vs T)</b>	-0,9 (-11,3 a 9,5)	0,862	-1,5 (-9,5 a 6,5)	0,712
Edat	-	-	-0,5 (-0,8 a -0,08)	0,020
Srm—Creatinini basal	0,20 (0,06 a 0,34)	0,007	0,40 (0,06 a 0,74)	0,022
Hematòcrit (%)	-0,9 (-1,7 a -0,1)	0,020	-	-
Srm—Colesterol AUC	5,3 (0,7 a 9,9)	0,026	-	-
Excreció de proteïna mitjana	9,2 (6,4 a 11,9)	$3,7 \times 10^{-10}$	7,9 (5,1 a 10,6)	$2,9 \times 10^{-7}$
Tensió arterial sistòlica AUC	0,4 (0,1 a 0,6)	0,005	-	-

**Taula 63** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model del model 1 (amb tots els homes) i el model 2 (només amb els homes amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant el **pendent de creatinini**.

**Polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2 en dones**

Variables de la regressió	Model 1 (n=116)		Model 2 (n=37)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
c.439+4C>T (CC vs TT)	6,2 (-9,3 a 21,8)	0,427	<b>CC vs T:</b> 1,4 (-6,4 a 9,3)	0,719
c.439+4C>T (CT vs TT)	5,7 (-10,1 a 21,6)	0,476		
Srm—Creatinini basal	0,25 (0,09 a 0,40)	0,003	0,25 (0,09 a 0,4)	0,003
Excreció de proteïna AUC	5,3 (3,4 a 7,2)	$1,8 \times 10^{-7}$	5,4 (3,5 a 7,2)	$1,5 \times 10^{-7}$

**Taula 64.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model 1 (amb totes les dones) i el model 2 (només amb les dones amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la **diferència anual relativa de creatinini**.

Variables de la regressió	Model 1 (n=116)		Model 2 (n=27)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
c.439+4C>T (CC vs TT)	20,6 (-20,4 a 61,5)	0,322	<b>CC vs T:</b> -2,8 (-23,6 a 18,1)	0,792
c.439+4C>T (CT vs TT)	27,7 (-14,2 a 69,5)	0,193		
Srm—Creatinini basal	0,7 (0,3 a 1,1)	0,002	0,7 (0,3 a 1,1)	0,002
Srm—Albúmina	-	-	3,1 (0,4 a 5,7)	0,023
Excreció de proteïna mitjana	23,3 (18,3 a 28,4)	$7,2 \times 10^{-15}$	23,5 (18,4 a 28,5)	$6,1 \times 10^{-15}$

**Taula 65.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model 1 (amb totes les dones) i el model 2 (només amb les dones amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant el **pendent de creatinini**.

**Polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 en homes**

Variables de la regressió	Model 1 (n=204)		Model 2 (n=86)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
c.1542-361C>G (G vs C)	1,4 (-1,6 a 4,3)	0,369	2,2 (-1,0 a 5,4)	0,168
Hematòcrit (%)	-0,4 (-0,7 a -0,1)	0,005	-	-
Excreció de proteïna AUC	3,8 (2,8 a 4,7)	$8,2 \times 10^{-13}$	4,3 (3,0 a 5,5)	$2,4 \times 10^{-9}$
Tensió arterial sistòlica AUC	0,10 (0,01 a 0,19)	0,025	-	-

**Taula 66.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model del model 1 (amb tots els homes) i el model 2 (només amb els homes amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del c.1542-361C>G del gen ACE2 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la **diferència anual relativa de creatinini**.

Variables de la regressió	Model 1 (n=204)		Model 2 (n=86)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>c.1542-361C&gt;G (G vs C)</b>	4,7 (-3,8 a 13,1)	0,279	3,1 (-4,8 a 10,9)	0,437
Edat	-	-	-0,5 (-0,8 a -0,1)	0,020
Srm—Creatinini basal	0,17 (0,03 a 0,32)	0,016	0,40 (0,02 a 0,70)	0,040
Hematòcrit (%)	-1,0 (-1,7 a -0,2)	0,013	-	-
Srm—Colesterol AUC	5,4 (0,8 a 10,0)	0,021	-	-
Excreció de proteïna mitjana	9,6 (6,8 a 12,4)	$1,6 \times 10^{-10}$	8,7 (5,7 a 11,7)	$1,8 \times 10^{-7}$
Tensió arterial sistòlica AUC	0,4 (0,1 a 0,6)	0,005	-	-

**Taula 67.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model 1 (amb tots els homes) i el model 2 (només amb els homes amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del c.1542-361C>G del gen ACE2 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant el **pendent de creatinini**.

### **Polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 en dones**

Variables de la regressió	Model 1 (n=116)		Model 2 (n=37)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>c.1542-361C&gt;G (GG vs CC)</b>	2,9 (-5,4 a 11,3)	0,486	<b>GG vs C:</b> 0,9 (-9,9 a 11,7)	0,869
<b>c.1542-361C&gt;G (GC vs CC)</b>	2,3 (-9,2 a 13,8)	0,693		
Srm—Creatinini basal	0,24 (0,09 a 0,40)	0,003	0,25 (0,09 a 0,4)	0,003
Excreció de proteïna AUC	5,4 (3,5 a 7,2)	$1,6 \times 10^{-7}$	5,4 (3,5 a 7,2)	$1,4 \times 10^{-7}$

**Taula 68.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model 1 (amb totes les dones) i el model 2 (només amb les dones amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la **diferència anual relativa de creatinini**.

Variables de la regressió	Model 1 (n=116)		Model 2 (n=27)	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>c.1542-361C&gt;G (GG vs CC)</b>	10,0 (-12,5 a 32,5)	0,381	<b>GG vs C:</b> -0,6 (-29,3 a 28,1)	0,967
<b>c.1542-361C&gt;G (GC vs CC)</b>	4,1 (-26,5 a 34,8)	0,790		
Edat	-	-	-1,3 (-2,6 a -0,0)	0,049
Srm—Creatinini basal	0,7 (0,3 a 1,1)	0,002	0,7 (0,3 a 1,1)	0,002
Srm—Albúmina	3,1 (0,5 a 5,8)	0,020	3,0 (0,4 a 5,6)	0,024
Excreció de proteïna mitjana	23,4 (18,3 a 28,4)	$9,5 \times 10^{-15}$	23,4 (18,4 a 28,5)	$7,1 \times 10^{-15}$

**Taula 69.** Coeficients de regressió  $\beta$ , interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model 1 (amb totes les dones) i el model 2 (només amb les dones amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) que mesuren l'efecte del polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant el **pendent de creatinini**.

### **Combinació de polimorfismes**

Els possibles al·lels que confereixen risc de progressió més ràpida de la nefropatia prenent com a criteri d'avaluació la diferència relativa anual de creatinini són: **D** (*ACE1*), **M** (*AGT*), **A** (c.186+2053G>A) i **G** (c.1542-361C>G). Si es pren el criteri "pendent de creatinini", els dos darrers polimorfismes no entren a l'estudi.

Es crea la variable "nº d'al·lels de risc" per cada una de les combinacions possibles de polimorfismes. Els millors models que s'obtenen de la combinació de 2, 3 i 4 polimorfismes es troben resumits a les *taules 70-72*, i s'han efectuat només pels pacients que van arribar a la primera consulta al nefròleg amb un MDRD > 60 mL/min/m<sup>2</sup>. Les combinacions obtingudes són similars a les obtingudes amb el criteri d'MDRD, encara que els coeficients de regressió corresponents al nº d'al·lels de risc s'han estimat amb menys significació estadística.

La **combinació de dos polimorfismes** que millor estima l'efecte sobre la progressió de la nefropatia és la formada per *ACE1* i *AGT*, on per cada al·lel de risc de més, l'augment anual de la concentració de creatinini en el plasma incrementa 3,3 mmol/L i l'augment relatiu de creatinini anual incrementa 1,3 unitats de percentatge. Això significa que un pacient amb els quatre al·lels de risc té un pendent de creatinini en el plasma 13,2 mmol/L més alt que un pacient que no tingui cap al·lel de risc.

La **combinació de tres polimorfismes** que millor estima l'efecte sobre la progressió de la nefropatia és la formada per *ACE1*, *AGT* i c.186+2053G>A de l'*ACE2*, on per cada al·lel de risc de més, l'augment relatiu de creatinini anual és de l'1,1% més. Això significa que un pacient amb els sis al·lels de risc té un augment anual relatiu de creatinini 6,6 unitats de percentatge més gran de mitjana que un pacient que no tingui cap al·lel de risc. Si la combinació de tres polimorfismes només la duem a terme amb els homes, obtenim un efecte additiu al dels altres dos polimorfismes: per cada al·lel de risc –**D** (*ACE1*), **M** (*AGT*) i **A** (c.186+2053G>A)– de més, l'augment relatiu de creatinini anual és de 1,6 unitats de percentatge més.

Finalment, la combinació de quatre polimorfismes –**D** (*ACE1*), **M** (*AGT*), **A** (c.186+2053G>A) i **G** (c.1542-361C>G)– no aporta cap millora del model de tres polimorfismes perquè l'efecte màxim que estima és inferior a l'obtingut en combinacions anteriors.

El polimorfisme c.1542-361C>G no sembla que aportï cap informació rellevant pel que fa a la progressió de la nefropatia, quan aquesta s'estima a través dels canvis en S<sub>rm</sub>—Creatinini.

**- Combinació de 2 polimorfismes: D (ACE1) + M (AGT)**

Variables de la regressió	dif anual relativa creatinini		pendent de creatinini	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>nº d'al·lels de risc (D+M)</b>	1,3 (0,01 a 2,7)	0,049	3,3 (0,1 a 6,5)	0,043
Hematòcrit (%)	-0,4 (-1,8 a -1,0)	0,022	-	-
Excreció de proteïna	5,3 (4,2 a 6,3)	$4,1 \times 10^{-17}$	10,2 (7,8 a 12,7)	$2,9 \times 10^{-13}$

**Taula 70.** Coeficients de regressió  $\beta$ , intervals de confiança del 95% i significació estadística del nº d'al·lels de risc **-D (ACE1) i M (AGT)**- i de les variables de control significatives que mesuren l'efecte del nº d'al·lels de risc sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa i el pendent de creatinini. S'han inclòs els pacients amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (n=123).

**- Combinació de 3 polimorfismes: D (ACE1) + M (AGT) + A (c.186+2053G>A)**

Variables de la regressió	dif anual relativa creatinini	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>nº d'al·lels de risc(D+M+A)</b>	1,1 (0,1 a 2,0)	0,028
Hematòcrit (%)	-0,4 (-0,7 a -0,1)	0,015
Excreció de proteïna	5,2 (4,2 a 6,2)	$4,1 \times 10^{-17}$

**Taula 71.** Coeficients de regressió  $\beta$ , intervals de confiança del 95% i significació estadística del nº d'al·lels de risc **-D (ACE1), M (AGT) i A (c.186+2053G>A)**- i de les variables de control significatives que mesuren l'efecte del nº d'al·lels de risc sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa de creatinini. S'han inclòs els pacients amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (n=123).

**només homes**

Variables de la regressió	dif anual relativa creatinini	
	$\beta$ (IC 95%)	<i>p</i>
<b>nº d'al·lels de risc(D+M+A)</b>	1,6 (0,5 a 2,7)	0,005
Edat	-	-
Srm—Creatinini basal	-	-
Excreció de proteïna	4,2 (3,1 a 5,3)	$8,4 \times 10^{-11}$

**Taula 72.** Coeficients de regressió  $\beta$ , intervals de confiança del 95% i significació estadística del nº d'al·lels de risc **-D (ACE1), M (AGT) i A (c.186+2053G>A)**- i de les variables de control significatives que mesuren l'efecte del nº d'al·lels de risc sobre la progressió de la nefropatia mesurada mitjançant la diferència anual relativa de creatinini. S'han inclòs els pacients **homes** amb l'MDRD basal  $\geq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (n=86).



### C. Regressions de Cox: temps necessari per doblar la concentració de creatinini en el plasma

A continuació s'esquematitzen les regressions de Cox que estudien l'efecte que té el genotip sobre el risc de doblar la concentració de creatinini en el plasma. És el darrer criteri que s'ha considerat per mesurar l'efecte genètic sobre la progressió de la nefropatia en pacients diabètics, i complementa els resultats presentats a l'apartat 4.2.3.

Tal com es pot observar a les *taules 73-81*, no s'ha obtingut cap efecte estadísticament significatiu del genotip sobre la progressió de la nefropatia si aquesta s'avalua mitjançant el risc de doblar la concentració de creatinini en el plasma.

#### Polimorfisme I/D del gen ACE1

Variables de la regressió	doblar creatinini	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
ACE1 (DD vs II)	1,6 (0,9 a 2,9)	0,142
ACE1 (ID vs II)	1,7 (0,9 a 3,1)	0,091
Srm—Creatinini basal	1,01 (1,00 a 1,02)	5,9x10 <sup>-5</sup>
Hematòcrit (%)	0,94 (0,90 a 0,98)	0,001
Excreció de proteïna AUC	1,4 (1,3 a 1,5)	9,6x10 <sup>-21</sup>
Tensió arterial sistòlica, mitjana	1,03 (1,01 a 1,04)	3,3x10 <sup>-5</sup>

**Taula 73.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model que mesura l'efecte del polimorfisme I/D del gen ACE1 sobre el risc que un pacient dobli la concentració de creatinini en el plasma (doblar creatinini).

#### Polimorfisme p.M235T del gen AGT

Variables de la regressió	doblar creatinini	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
AGT (MM vs TT)	1,6 (0,9 a 3,1)	0,127
AGT (MT vs TT)	1,3 (0,7 a 2,4)	0,420
Srm—Creatinini basal	1,01 (1,01 a 1,02)	0,0002
Hematòcrit (%)	0,94 (0,90 a 0,97)	0,001
Excreció de proteïna AUC	1,4 (1,3 a 1,5)	4,1x10 <sup>-19</sup>
Tensió arterial sistòlica, mitjana	1,03 (1,01 a 1,04)	6,5x10 <sup>-5</sup>

**Taula 74.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model que mesura l'efecte del polimorfisme p.M235T del gen AGT sobre el risc que un pacient dobli la concentració de creatinini en el plasma (doblar creatinini).

**Polimorfisme g.1166A>C del gen AGTR1**

Variables de la regressió	doblar creatinini	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
<b>AGTR1 (CC vs AA)</b>	1,3 (0,5 a 3,3)	0,541
<b>AGTR1 (AC vs AA)</b>	1,6 (0,6 a 4,0)	0,305
Srm—Creatinini basal	1,02 (1,01 a 1,02)	3,8x10 <sup>-5</sup>
Hematòcrit (%)	0,94 (0,90 a 0,98)	0,002
Excreció de proteïna AUC	1,4 (1,3 a 1,5)	8,0x10 <sup>-19</sup>
Tensió arterial sistòlica, mitjana	1,03 (1,01 a 1,04)	3,7x10 <sup>-5</sup>

**Taula 75.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model que mesura l'efecte del polimorfisme g.1166A>C del gen AGTR1 sobre el risc que un pacient dobli la concentració de creatinini en el plasma (doblar creatinini).

**Polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2****homes**

Variables de la regressió	doblar creatinini	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
<b>A&gt;G ACE2 (A vs G)</b>	1,4 (0,8 a 2,4)	0,259
Srm—Creatinini basal	1,01 (1,00 a 1,02)	0,017
Hematòcrit (%)	0,91 (0,86 a 0,95)	0,0002
Excreció de proteïna AUC	1,6 (1,4 a 1,9)	8,0x10 <sup>-19</sup>

**Taula 76.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model que mesura l'efecte del polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 en els homes sobre el risc que un pacient dobli la concentració de creatinini en el plasma (doblar creatinini).

**dones**

Variables de la regressió	doblar creatinini	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
<b>A&gt;G ACE2 (AA vs GG)</b>	0,8 (0,2 a 3,1)	0,734
<b>A&gt;G ACE2 (AG vs GG)</b>	1,2 (0,5 a 2,6)	0,734
Srm—Creatinini basal	1,02 (1,00 a 1,03)	0,037
Excreció de proteïna AUC	1,4 (1,2 a 1,5)	1,4x10 <sup>-8</sup>
Tensió arterial sistòlica, mitjana	1,04 (1,01 a 1,06)	0,002

**Taula 77.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model que mesura l'efecte del polimorfisme c.186+2053G>A del gen ACE2 en les dones sobre el risc que un pacient dobli la concentració de creatinini en el plasma (doblar creatinini).

**Polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2****homes**

Variables de la regressió	doblar creatinini	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
<b>C&gt;T ACE2 (C vs T)</b>	1,2 (0,6 a 2,3)	0,646
Srm—Creatinini basal	1,01 (1,00 a 1,02)	0,004
Hematòcrit (%)	0,92 (0,88 a 0,97)	0,001
Excreció de proteïna AUC	1,5 (1,3 a 1,8)	4,6×10 <sup>-9</sup>

**Taula 78.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model que mesura l'efecte del polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2 en els homes sobre el risc que un pacient dobli la concentració de creatinini en el plasma (doblar creatinini).

**dones**

Variables de la regressió	doblar creatinini	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
<b>C&gt;T ACE2 (CC vs TT)</b>	1,7 (0,4 a 8,1)	0,495
<b>C&gt;T ACE2 (CT vs TT)</b>	1,4 (0,3 a 6,7)	0,651
Srm—Creatinini basal	1,02 (1,00 a 1,03)	0,027
Excreció de proteïna AUC	1,4 (1,2 a 1,5)	7,6×10 <sup>-8</sup>
Tensió arterial sistòlica, mitjana	1,04 (1,01 a 1,06)	0,002

**Taula 79.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model que mesura l'efecte del polimorfisme c.439+4C>T del gen ACE2 en les dones sobre el risc que un pacient dobli la concentració de creatinini en el plasma (doblar creatinini).

**Polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2****homes**

Variables de la regressió	doblar creatinini	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
<b>G&gt;C ACE2 (G vs C)</b>	1,3 (0,7 a 2,2)	0,440
Srm—Creatinini basal	1,02 (1,01 a 1,02)	0,001
Hematòcrit (%)	0,92 (0,88 a 0,97)	0,001
Excreció de proteïna AUC	1,5 (1,3 a 1,7)	1,6×10 <sup>-8</sup>

**Taula 80.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model que mesura l'efecte del polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 en els homes sobre el risc que un pacient dobli la concentració de creatinini en el plasma (doblar creatinini).

**dones**

Variables de la regressió	doblar creatinini	
	e <sup>β</sup> (IC 95%)	p
C>T ACE2 (CC vs TT)	1,3 (0,4 a 4,0)	0,653
C>T ACE2 (CT vs TT)	0,8 (0,4 a 2,0)	0,698
Srm—Creatinini basal	1,02 (1,00 a 1,03)	0,030
Excreció de proteïna AUC	1,4 (1,2 a 1,5)	2,1x10 <sup>-9</sup>
Tensió arterial sistòlica, mitjana	1,04 (1,01 a 1,06)	0,002

**Taula 81.** Coeficients de regressió de Cox e<sup>β</sup>, interval de confiança del 95% i significació estadística del genotip i de les variables de control significatives del model que mesura l'efecte del polimorfisme c.1542-361C>G del gen ACE2 en les dones sobre el risc que un pacient dobli la concentració de creatinini en el plasma (doblar creatinini).

## **8. BIBLIOGRAFIA**



1. Martínez Castela A. Avances en diabetes mellitus, nefropatía diabética, síndrome metabólico y riesgo cardio-vásculo-renal. *Nefrología* 2008;Supl 5:79-84.
2. Martínez Castela A, De Alvaro F, Górriz JL. Epidemiology of diabetic nephropathy in Spain. *Kidney Int Suppl.* 2005;Suppl 99:S20-4.
3. King H, Aubert RE, Herman WH. Global Burden of Diabetes, 1995-2025. Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998;21:1414-1431.
4. Lurbe Ferrer E. Nefropatías glomerulares secundarias i Figuerola Pino D, Reynals de Blasis E, Ruiz M, Vidal Ruiz A, Castaño González L. *Diabetes mellitus. A: Farreras P, Rozman C. Medicina Interna. XV edición Madrid: Elsevier;2004.*
5. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. KDOQI Guideline 14. Association of Chronic Kidney Disease With Diabetic Complications S198 a: NKF KDOQI. Clinical practice guidelines for chronic disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis,* 2002;39:S1-266.
6. Levey AS, Eckardt KU, Tsuchimoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J *et al.* Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2005;67:2089-100.
7. Górriz Teruel JL, Otero González A. Social and health impact of advanced chronic kidney disease. *Nefrología* 2008;28 Suppl 3:7-15.
8. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Disease* 2007;49:S12-154.
9. Goday, A. Epidemiology of diabetes and its non-coronary complications. *Rev Esp Cardiol.* 2002, 55;657-70.
10. Rodríguez Artalejo F. Epidemiología de la nefropatía diabética en España (hechos y cifras). *Rev Esp Cardiol* 2007;7:5-8.
11. Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications (DCCT) Research Group. *Kidney Int* 47:1703-1720,1995.
12. Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW *et al.* National Kidney Foundation Practice Guideline for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. *Ann Intern Med.* 2003; 139:137-147.

13. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*, 2000; 275:33238-43.
14. The ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics. Enzyme nomenclature database. <http://www.expasy.org/enzym/> [Últim accés: 08/08/2009].
15. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J *et al.* Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2002;277:14838-43.
16. Bohem M, Nabel EG. Angiotensin-converting enzyme 2: a new cardiac regulator. *New Eng J Med*, 2002;347:1795-7.
17. Gurley SB, Allred A, Le TH, Griffiths, R Mao L, Philip N *et al.* Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *J. Clin. Invest*, 2006;116: 2218-2225.
18. Katovich MJ, Grobe JL, Huentelman M, Raizada MK. Angiotensin-converting enzyme 2 as a novel target for gene therapy for hypertension. *Exp Physiol*. 2005;90:299-305.
19. Cooper ME, Bonnet F, Oldfield M, Jandeleit-Dahm K. Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. *Am J Hypertens*, 2001; 14:475-486
20. Leehey DJ, Singh AK, Alavi N, Singh R. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 2000;58(S77):S93-S98.
21. Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med*. 2004;116:263-72.
22. Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P. The role fo renin-angiotensin-aldosterone system in the progressin of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2005;S57-65.
23. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. KDOQI Clinical practice guidelines for chronic disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis*, 2002;39:S1-266.
24. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D *et al.* A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med*, 1999; 130:461-70.
25. Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenenti P. Clinical practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2002;346:1145-51.



26. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Lancet* 2000;355:253-9.
27. Parving H-H, Lehnert H, Bröchner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001;345:870-8.
28. Pohl MA, Blumenthal S, Cordonnier DJ, De Alvaro F, Deferrari G, Eisner G *et al.* Independent and additive impact of blood pressure control and angiotensin II receptor blockade on renal outcomes in the irbesartan diabetic nephropathy trial: clinical implications and limitations. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3027-37.
29. Deferrari G, Ravera M, Berruti V, Leoncini G, Deferrari L. Optimizing therapy in the diabetic patient with renal disease: antihypertensive treatment. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(Suppl 1):S6-S11.
30. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH *et al.* Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2001;345:861-9.
31. Herman WH, Shahinfar S, Carides GW, Dasbach EJ, Gerth WC, Alexander CM *et al.* Losartan reduces the costs associated with diabetic end-stage renal disease: the RENAAL study economic evaluation. *Diabetes Care* 2003;26:683-7.
32. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB *et al.* Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001;345:851-60.
33. Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, Pogue J *et al.*; ONTARGET investigators. Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet*. 2008;372:547-53.
34. Schindler C. ACE-inhibitor, AT1-receptor-antagonist, or both? A clinical pharmacologist's perspective after publication of the results of ONTARGET. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2008;2:233-48.
35. Parving HH, de Zeeuw D, Cooper ME, Remuzzi G, Liu N, Linceford J *et al.* ACE gene polymorphism and losartan treatment in type 2 diabetic patients with nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:771-9.

36. Ruggenenti P, Bettinaglio P, Pinares F, Remuzzi G. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism and renoprotection in diabetic and nondiabetic nephropathies. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3:1511-25.
37. Egido J, Ortiz A. ACE gene polymorphism and the prognosis and treatment of overt diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008;4:472-3.
38. Marcelli D. Prognosis of Diabetic Patients on dialysis: analysis of Lombardy Registry data. *Nephrol Dial Transplant*, 1995; 10:1895-900.
39. Cases A, Vera M, López Gómez JM. Cardiovascular risk in patients with chronic renal failure. Patients in renal replacement therapy. *Nefrologia*. 2002;S1:68-74.
40. Van Dijk PC, Jager KJ, De Charro F, Collart F, Cornet R, Dekker FW *et al*. Renal replacement therapy in Europe: The results of a collaborative effort by the ERA-EDTA registry and six national or regional registries. *Nephrol Dial Transplant*, 2001;16:1120-29.
41. Ceballos M, López-Revuelta K, Saracho R, García López F, Castro P, Gutiérrez JA *et al*. Informe de diálisis y trasplante correspondiente al año 2002 de la Sociedad Española de Nefrología y Registros Autonómicos. *Nefrología* 2005;25:121-129.
42. Registre de malalts renals de Catalunya. Informe estadístic, 2004. Generalitat de Catalunya. Servei Català de la Salut. Barcelona, 2006.
43. Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease: evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1989; 320:1161-1165.
44. Satko SG, Sedor JR, Iyengar SK, Freedman BI. Familial clustering of chronic kidney disease. *Semin Dial*. 2007;20:229-36.
45. Ewens KG, George RA, Sharma K, Aiyadeh FN, Spielman R. Assessment of 115 Candidate Genes for Diabetic Nephropathy by Transmission/Disequilibrium Test. *Diabetes*, 2005;54:3305-3318.
46. Tanaka N, Babozono T. Assessing genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. 2005;10:S17-21.
47. Freedman BI, Bostrom M, Daeihagh P, Bowden DW. Genetic factors in diabetic nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2:1306-16.
48. Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herbeth B, Andre JL, Rakotovao R, Gonzales MF, Allegrini J, Bloch C. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy study. *Am J Hum Genet*, 1988;43:774-780.

49. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene. *Nucleic Acids Res*, 1992;20:1433.
50. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas f, Cambien F, Crvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*, 1990;86:1343-1346.
51. Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, Saavedra AP, Vlietinck R *et al*. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertension* 1997;15:1579-92.
52. Möllsten A, Kockum I, Svensson M, Rudberg S, Ugarph-Morawski A, Brismar K *et al*. The effect of polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system on diabetic nephropathy risk. *J Diabetes Complications*. 2008;22:377-83.
53. Kennon B, Petrie JR, Small M, Connell JM. Angiotensin-converting enzyme gene and diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999;16:448-58.
54. Higashiesato Y, Tana T, Tozawa M, Iseki C, Iseki K, Fukiyama K, Takishita S. Angiotensin-converting enzyme (ACE) insertion/deletion polymorphism and survival in a cohort of chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol*, 2002;58:370-5.
55. Van der Sman-De Beer F, Verhangen C, Rombach SM, Boorsma P, van Manen JG, Korevaar JC *et al*. ACE I/D polymorphism is associated with mortality in a cohort study of patients starting with dialysis. *Kidney International*, 2005;68:2237-43.
56. Ishimitsu T, Hosoya K, Matsuoka H. The deletion allele of angiotensin-converting Enzyme Gene Polymorphism as a Cardiovascular Risk Factor in Patients Undergoing Long-Term Hemodialysis. *Annals of Internal Medicine*, 2000;133:924.
57. Lieb W, Graf J, Götz A, König IR, Mayer B, Fischer M *et al*. Association of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) gene polymorphisms with parameters of left ventricular hypertrophy in men. Results of the MONICA Augsburg echocardiographic substudy. *J Mol Med* 2005;84:88-96.
58. Goulter AB, Goddard MJ, Allen JC, Clark KL. ACE2 gene expression is up-regulated in the human failing heart. *BMC Med* 2004;19:2-19.
59. Oudit GY, Herzenberg AM, Kassiri Z, Wong D, Reich H, Khokha R *et al*. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis. *Am J Pathol*, 2006;168:1808-20.

60. Ye M, Wysocki J, William J, Soler MJ, Cokic I, Batlle D. Glomerular localization and expression of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:3067-75.
61. Soler MJ, Wysocki J, Ye M, Lloveras J, Kanwar Y, Batlle D. ACE2 inhibition worsens glomerular injury in association with increased ACE expression in streptozotocin-induced diabetic mice. *Kidney Int.* 2007;72:614-23.
62. Reich HN, Oudit GY, Penninger JM, Scholey JW, Herzenberg AM. Decreased glomerular and tubular expression of ACE2 in patients with type 2 diabetes and kidney disease. *Kidney Int* 2008;74:1610-6.
63. Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J *et al.* Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension*, 2003; 41:390-1.
64. Lely AT, Hamming I, van Goor H, Navis GJ. Renal ACE2 expression in human kidney disease. *J Pathol*, 2004;204:587-93.
65. Danilczyk U, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res*, 2006;98:463-71.
66. Ye M, Wysocki J, Naaz O, Salabat MR, LaPointe Ms, Batlle D. Increased ACE2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice: a renoprotective combination? *Hypertension* 2004;43:1120-5.
67. Mizuiri S, Hemmi H, Arita M, Ohashi Y, Tanaka Y, Miyagi M, *et al.* Expression of ACE and ACE2 in individuals with diabetic kidney disease and healthy controls. *Am J Kidney Dis.* 2008;51:613-23.
68. Fröjdö S, Sjölin L, Parkkonen M, Mäkinen VP, Kilipikari R, Pettersson-Fernholm K *et al.* Polymorphisms in the gene encoding angiotensin I converting enzyme 2 and diabetic nephropathy. *Diabetologia*, 2005;48:2278-2281.
69. van der Merwe L, Cloete R, Revera M, Heradien M, Goosen A, Corfield VA *et al.* Genetic variation in angiotensin-converting enzyme 2 gene is associated with extent of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Genet.* 2008;124:57-61.
70. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A *et al.* Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71: 7-20.
71. Azizi M, Hallouin MC, Jeunemaitre X, Guyene TT, Menard J. Influence of the M235T polymorphism of human angiotensinogen (AGT) on plasma AGT and renin concentrations after ethinylestradiol administration. *J. Clin. Endocr. Metab.* 2000;85: 4331-7.

72. Osawa N, Koya D, Araki S, Uzu T, Tsunoda T, Kashiwagi A, Nakamura Y, Maeda S. Combinational effect of gens for the renin-angiotensin system in conferring susceptibility to diabetic nephropathy. *J Hum Genet*, 2007;52:143-151.
73. Jacobsen P, Tarnow L, Carstensen B, Hovind P, Poirier O, Parving HH. Genetic variation in the Renin-Angiotensin system and progression of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2003;14:2843-50.
74. Hadjadj S, Belloum R, Bouhanick B, Gallois Y, Guilloteau G, Chatellier G, Alhenc-Gelas F, Marre M. Prognostic value of angiotensin-I converting enzyme I/D polymorphism for nephropathy in type 1 diabetes mellitus: a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:541-9.
75. Tien KJ, Hsiao JY, Hsu SC, Liang HT, Lin SR, Chen HC, Hsieh MC. Gender-dependent effect of ACE I/D and AGT M235T polymorphisms on the progression of urinary albumin excretion in Taiwanese with type 2 diabetes. *Am J Nephrol*. 2009;29:299-308.
76. 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;50:657-64.
77. Martin MM, Willardson BM, Burton GF, White CR, McLaughlin JN, Bray SM, Ogilvie JW, Elton TS. Human angiotensin II type 1 receptor isoforms encoded by messenger RNA splice variants are functionally distinct. *Molec. Endocr*, 2001; 15: 281-293.
78. Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Féry I, Charru A. Clauser E *et al*. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension*, 1994; 24:63-69.
79. Wang WYS, Zee RYL, Morris BJ. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. *Clin. Genet*, 1997; 51:31-4.
80. 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;28:141-50.
81. Buraczynska M, Ksiazek P, Drop A, Zaluska W, Spasiewicz D, Ksiazek A. Genetic polymorphism of the renin-angiotensin system in end-stage renal disease. *Nephrol dial Transplant* 2005;21:979-83.
82. de Zeeuw D, Remuzzi G, Parving HH, Keane WF, Zhang Z, Shahinfar S, Snapinn S, Cooper ME, Mitch WE, Brenner BM. Proteinuria, a target for renoprotection in patients with type 2 diabetic nephropathy: lessons from RENAAL. *Kidney Int*. 2004;65:2309-20.

83. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. KDOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. Part 7. Stratification of risk for progression of kidney disease and development of cardiovascular disease. Guideline 13. Factors associated with loss of kidney function in chronic kidney disease. 2002. [http://www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines\\_ckd/p7\\_risk\\_g13 .htm](http://www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines_ckd/p7_risk_g13.htm) [Consulta: 2009-09-11].
84. Levey AS: Nephrology Forum: Measurement of renal function in chronic renal disease. *Kidney Int* 1990;38:167-84.
85. Walser M. Progression of chronic renal failure in man. *Kidney Int* 1990;37:1195-210.
86. Lovati E, Richard A, Frey BM, Ferrari P. Genetic polymorphisms of the rennin-angiotensin-aldosterone system in end-stage renal disease. *Kidney International*, 2001; 30:46-54.
87. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulated extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- $\beta$  expression in rat glomerular cells. *J Clin Invest*, 1994;93:2431-7.
88. Berger M, Mönks D, Wanner C, Lindner TH. Diabetic nephropathy: an inherited disease or just a diabetic complication? *Kidney Blood Press Res*. 2003;26:143-54.
89. Doi K, Okamoto K, Tokunaga K, Fujita T, Noiri E. Genome study of kidney disease in the age of post genome-sequencing. *Endocr Metab Immuno Disord Drug Targets*. 2008;8:173-83.
90. Lindner TH, Mönks D, Wanner C, Berger M. Genetic aspects fo diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2003;84:S186-91.
91. Placha G, Canani LH, Warram JH, Krolewski AS. Evidence for different susceptibility genes for proteinuria and ESRD in type 2 diabetes. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2005;12:155-69.
92. Marré M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C *et al*. Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*. 1997;99:1585-95.
93. Gohda T, Tanimoto M, Watanabe-Yamada K, Matsumoto M, Kaneko S, Hagiwara S, Shiina K, Shike T, Funabiki K, Tomino Y. Genetic susceptibility to type 2 diabetic nephropathy in human and animal models. *Nephrology (Carlton)*. 2005;10 Suppl:S22-5.
94. Palmer BR, Jarvis MD, Pilbrow AP, Ellis KL, Frampton CM, Skelton L, *et al*. Angiotensin-converting enzyme 2 A1075G polymorphism is associated with survival in an acute coronary syndromes cohort. *Am Heart J*. 2008;156:752-8.

95. Lin CL, Chuang FR, Wu CF Yang CT. Early referral as an independent predictor of clinical outcome in end-stage renal disease on hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ren Fail*, 2004;26:531-7.
96. Lameire N, Jager K, Van Biesen W, de Bacquer D, Vanholder R. Chronic Kidney disease: A European perspective. *Kidney Int Suppl*. 2005;99:S30-8.
97. Annear NM, Banerjee D, Joseph J, Harries TH, Rahman S, Eastwood JB. Prevalence of chronic kidney disease stages 3-5 among acute medical admissions: another opportunity for screening. *QJM*. 2008;101:91-7.
98. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations 2006 Updates. Hemodialysis Adequacy and Peritoneal Dialysis Adequacy. 2006. [http://www.kidney.org/Professionals/kdoqi/guideline\\_upHD\\_PD\\_VA/index.htm](http://www.kidney.org/Professionals/kdoqi/guideline_upHD_PD_VA/index.htm) [Consulta: 2009-09-11]
99. Vonesh EF, Snyder JJ, Foley RN, Collins AJ. Mortality studies comparing peritoneal dialysis and hemodialysis: what do they tell us? *Kidney Int Suppl*, 2006;103:S3:11.
100. Pollock CA, Cooper BA, Harris DC. Early start peritoneal dialysis. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2007;14:E27-34.
101. Keane WF, Zhang Z, Lyle PA, Cooper Me, de Zeeuw D, Grunfeld JP *et al*. Risk scores for predicting outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy: the RENAAL study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:761-7.
102. Keane WF, Lyle PA. Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Receptor Antagonist Losartan study. Recent advances in management of type 2 diabetes and nephropathy: lessons from the RENAAL study. *Am J Kidney Dis* 2003;41(Suppl 1):S22-5.
103. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. KDOQI clinical guidelines for peritoneal dialysis adequacy. Assessment of Nutritional Status Specifically as it relates to peritoneal dialysis. Guideline 12: Assessment of Nutritional Status. 2001. <[http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines\\_updates/doqiuppd\\_iv.html](http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_updates/doqiuppd_iv.html)>. [Consulta: 2009-09-11]
104. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. KDOQI Clinical practice guidelines for cardiovascular disease in dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005;45:S1–153.
105. Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, Saavedra AP, Soubrier F *et al*. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular–renal risk. *J Hypertens*, 1997;15:1579-92.
106. Hadjadj S, Fumeron F, Roussel R, Saulnier PJ, Gallois Y *et al*. Prognostic value of the insertion/deletion polymorphism of the ACE gene in type 2 diabetic subjects: results from

- the Non-insulin-dependent Diabetes, Hypertension, Microalbuminuria or Proteinuria, Cardiovascular Events, and Ramipril (DIABHYCAR), Diabete de type 2, Nephropathie et Genetique (DIAB2NEPHROGENE), and Survie, Diabete de type 2 et Genetique (SURDIAGENE) studies. *Diabetes Care*. 2008;31:1847-52.
107. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen, A. ACE Gene Polymorphism in Cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000; 20:484-92.
108. Sakka Y, Babazono T, Sato A, Ujihara N, Iwamoto Y. ACE gene polymorphism, left ventricular geometry, and mortality in diabetic patients with end-stage renal disease. *Diabetes Res Clin Pract*. 2004;64:41-49.
109. Böger CA, Götz AK, Krüger B, Hösl M, Schmitz G, Riegger GA, Krämer BK. Effect of genetic variation on therapy with angiotensin converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers in dialysis patients. *Eur J Med Res*. 2005;10:161-8.
110. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. Guideline1: Screening and diagnosis of diabetic kidney disease. 2007. [http://www.kidney.org/professionals/Kdoqi/guideline\\_diabetes/guide1.htm](http://www.kidney.org/professionals/Kdoqi/guideline_diabetes/guide1.htm)[Consulta: 2009-09-11]
111. International Diabetes Federation (IDF). Clinical Guidelines Task Force. Global Guideline for Type 2 Diabetes. Brussels: International Diabetes Federation, 2005.
112. Ng DP, Tai BC, Lim XL. Is the presence of retinopathy of practical value in defining cases of diabetic nephropathy in genetic association studies? The experience with the ACE insertion/deletion polymorphism in 53 studies comprising 17791 subjects. *Diabetes*. 2008;57:2541-6.
113. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 1998;339:1448-56.
114. Bakris GL, Weir MR, Shanifar S, Zhang Z, Douglas J, van Dijk DJ *et al*. Effects of blood pressure level on progression of diabetic nephropathy: results from the RENAAL study. *Arch Intern Med* 2003;163:1555-65.
115. Inaba M, Okuno S, Kumeda Y, Yamada S, Imanishi Y, Tabata T *et al*. Osaka CKD Expert Research Group. Glycated albumin is a better glycemic indicator than glycated hemoglobin values in hemodialysis patients with diabetes: effect of anemia and erythropoietin injection. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:896-903.



116. Kimura H, Gejyo F, Suzuki Y, Suzuki S, Miyazaki R, Arakawa M. Polymorphisms of angiotensin converting enzyme and plasminogen activator inhibitor-1 genes in diabetes and macroangiopathy. *Kidney Int.* 1998;54:1659-69.
117. Coll E, Campos B, González-Núñez D, Botey A, Poch E. Association between the A1166C polymorphism of the angiotensin II receptor type 1 and progression of chronic renal insufficiency. *J Nephrol.* 2003;16:357-64.
118. Konoshita T, Wakahara S, Mizuno S, Motomura M, Aoyama C, Makino Y *et al.* Tissue gene expression of renin-angiotensin system in human type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 2006;29:848-52.
119. Palomo-Piñón S, Gutiérrez-Rodríguez ME, Díaz-Flores M, Sánchez-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 (Carlton).* 2009;14:235-9.
120. Ng DP, Tai BC, Koh D. Angiotensin-I-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and its association with diabetic nephropathy: a meta-analysis of studies reported between 1994 and 2004 and comparing 14727 subjects. *Diabetologia.* 2005;48:1008-16.