

# Asociación de diversos polimorfismos de genes del sistema renina-angiotensina y la progresión de la nefropatía en diabéticos de tipo II. Genes del sistema renina-angiotensina y nefropatía\*

P Calzada<sup>1</sup>, P Alía<sup>1</sup>, MT González<sup>2</sup>

## Resumen

*El desarrollo de la nefropatía en individuos diabéticos depende tanto de factores metabólicos como de factores genéticos; entre los genes candidatos se encuentran los de las proteínas del sistema renina-angiotensina, el cual puede estar implicado en el desarrollo de las lesiones renales mediante el incremento de la presión glomerular.*

*El objetivo de este trabajo fue estudiar la asociación entre tres polimorfismos del sistema renina-angiotensina (M235T del gen AGT, que codifica el angiotensinógeno, I/D del gen ACE, que codifica la peptidil dipeptidasa A o enzima convertidora de angiotensina II, y A1166C del gen ATR1, que codifica el receptor de tipo I de la angiotensina II) y la progresión de la nefropatía, evaluada mediante el incremento en la concentración sérica de creatinina, en individuos con diabetes mellitus de tipo II sometidos a protocolos similares de control de la concentración de glucosa en sangre y de la presión arterial.*

*De entre la población de pacientes que atiende el Servicio de Nefrología del Hospital de Bellvitge se seleccionaron 192 pacientes diabéticos con una nefropatía crónica de al menos dos años de evolución y que no superaban una concentración de creatinina en suero de 200  $\mu\text{mol/L}$  en su primera visita al Servicio. Una vez realizados los análisis genotípicos, los individuos se clasificaron en función de su genotipo. Para cada uno de los genotipos, se calcularon los incrementos en la concentración sérica de creatinina experimentados a lo largo de los dos años del seguimiento, y se compararon entre sí. Puesto que existía cierta heterogeneidad entre los genotipos en las condiciones de partida (al menos en la concentración de creatinina basal), se llevó a cabo un análisis de regresión lineal múltiple que permitió ajustar por las posibles variables de confusión.*

*Algunos trabajos mencionados en la bibliografía apuntaban a la existencia de asociación entre los polimorfismos del sistema renina-angiotensina y la nefropatía diabética, por lo que resultaba oportuno estudiar esta hipótesis. Nuestro propio grupo, en un estudio preliminar cuyos resultados fueron presentados en el XXII Congreso Nacional de la SEQC del año 2003, apuntábamos a la existencia de diferencias significativas en el incremento de la concentración de creatinina entre algunos de los genotipos del gen AT1R. Sin embargo, los resultados obtenidos en el estudio actual han mostrado que, en los individuos diabéticos tipo II sometidos a protocolos similares de control glucémico y de control de la presión arterial, los polimorfismos M235T de AGT, I/D de ACE y A1166C de ATR1 no influyen en la progresión de la nefropatía en dos años, evaluada mediante el incremento en la concentración sérica de creatinina. Por tanto, para establecer el verdadero papel de estos polimorfismos es necesario realizar un estudio con un seguimiento de los pacientes a más largo plazo, donde se utilice un marcador de progresión de la enfermedad más sensible que la concentración de creatinina en suero y se examine la interacción entre los genes.*

**Palabras clave:** Peptidil-dipeptidasa A. Angiotensinógeno. Receptor de la Angiotensina de tipo I. Nefropatía diabética. Polimorfismo genético.

## Summary. Association between several genetic polymorphisms of renin-angiotensin system and progression of nephropathy in type II diabetics.

*In diabetic individuals, progression to diabetic nephropathy depends on both metabolic and genetic factors. Probable candidates are genes encoding proteins that take part in the renin-angiotensin system (RAS), which can be involved in the development of renal damage by increasing the glomerular pressure.*

*The aim of this work was to study the association between three polymorphisms in the RAS – M235T for the angiotensinogen (AGT), I/D for the angiotensin converting enzyme (ACE), and A1166C for the angiotensin II subtype 1 receptor (ATR1) – and the progression of nephropathy, assessed by an increase in serum creatinine concentration, in patients with type II diabetes mellitus under similar treatments for the control of glycaemia and arterial pressure.*

*From the population attended by the Nephrology Service at Bellvitge Hospital, 192 diabetic patients were selected; in the subjects included, chronic nephropathy had been established for at least two years and initial creatinine concentration was not greater than 200  $\mu\text{mol/L}$  at their first visit. After the genotype analyses were made, patients were classified by their genotypes. Two-year creatinine increments were calculated for each genotype, and they were compared between genotypes. Due to some heterogeneity in the initial conditions between the genotypes, at least in baseline creatinine concentration, a multiple regression analysis was made to adjust by confounding variables.*

*Because of several studies mentioned by the bibliography, supporting the idea of an association between RAS polymorphisms and diabetic nephropathy, it seemed appropriate to study this hypothesis. In a preliminary study, whose results were presented in the National Congress of the SEQC (2003), we pointed out the existence of significant differences in the increase of creatinine con-*

<sup>1</sup> Sección de Bioquímica Hormonal y Génica, Servicio de Bioquímica,

<sup>2</sup> Servicio de Nefrología. Hospital Universitario de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat (Barcelona)

\*Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el 15th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine y el XXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrados en Barcelona del 1 al 5 de junio de 2003

*centrations between some of the genotypes of ATR1 gene. The results of the present study have showed, however, that, in patients with type II diabetes mellitus under similar treatments for glycemic control and arterial pressure, M235T of AGT, I/D of ACE and A1166C of ATR1 are not associated with two-year progression of nephropathy, as measured by serum creatinine concentration. Thus, a more long-term follow-up study is needed to establish the actual role of these polymorphisms, using a more sensitive marker of disease progression and examining gene-gene interaction.*

**Keywords:** *Peptidyl-dipeptidase A. Angiotensinogen. Receptor, Angiotensin, Type I. Diabetic nephropathies. Polymorphism, Genetic.*

## INTRODUCCIÓN

La nefropatía es una complicación habitual en los pacientes diabéticos y representa una causa cada vez más frecuente de insuficiencia renal terminal. Su desarrollo depende de una combinación de factores ambientales, entre los que se incluyen factores metabólicos del individuo, como la concentración sérica de glucosa, y de la existencia de una susceptibilidad de base genética (1).

Los genes de susceptibilidad a la nefropatía no han sido identificados, y en los últimos años se están dedicando grandes esfuerzos a su búsqueda (2). Algunos de los genes candidatos son los de los componentes del sistema renina-angiotensina, un sistema de procesos en cascada que, a través de la angiotensina II, podría estar implicado en las anomalías funcionales y estructurales propias de la nefropatía en diabéticos (3): por un lado, el incremento de la presión sistémica y glomerular, debido a la acción vasoconstrictora de la angiotensina II y, por otro, la proliferación de las células mesangiales y la síntesis de matriz extracelular en el riñón, debido a su acción de estimulación del crecimiento. La mayor evidencia de la implicación del sistema renina-angiotensina en el desarrollo de la nefropatía diabética es la eficacia de los actuales tratamientos farmacológicos que lo bloquean.

La actividad del sistema renina-angiotensina depende de la totalidad de sus componentes: el angiotensinógeno, que es el precursor, dos enzimas, la renina y la peptidil dipeptidasa A, que actúan secuencialmente para producir angiotensina II, y sus receptores celulares específicos, especialmente el denominado receptor de tipo I de la angiotensina II. Tanto la sobreexpresión de cualquiera de estos componentes como la mayor actividad de las enzimas o la mayor afinidad del receptor por su ligando pueden conducir a una sobreactivación del sistema.

Varios componentes del sistema-renina-angiotensina presentan variantes genéticas relacionadas con una expresión variable de la proteína. En primer lugar, el polimorfismo I/D del gen ACE, que codifica la peptidil dipeptidasa A, que consiste en la presencia (inserción, I) o ausencia (delección, D) de una secuencia de ADN de 287 pares de bases en el gen. El alelo D se asocia con actividades plasmáticas de la enzima más elevadas (4) y, aunque ha habido disparidad de resultados en los trabajos publicados, dos metaanálisis sugieren una asociación entre la presencia del alelo D y la predisposición a la nefropatía diabética (5, 6); y, además, hay pruebas de que el polimorfismo de ACE puede afectar a la progresión de la nefropatía diabética (7, 8).

Para el gen AGT, que codifica el angiotensinógeno, el polimorfismo más estudiado es el M235T, consistente en la sustitución de una metionina por una treonina en la posición 235 de la secuencia de aminoácidos; esta variante está relacionada con una mayor concentración de la proteína en plasma (9)

y un metaanálisis concluye que el alelo T está asociado con aumento en el riesgo de hipertensión (10); hay sin embargo menos datos que apoyen la existencia de una asociación con la nefropatía diabética (11).

En cuanto al gen ATR1, del receptor I de la angiotensina II, el polimorfismo más estudiado es el A1166C. Esta variante, que consiste en la sustitución de una adenina por una citosina en la posición 1166 del gen del receptor de la angiotensina II, se ha relacionado con la hipertensión esencial, siendo el genotipo CC el más frecuente en los individuos hipertensos (12). Su asociación con la nefropatía está aún por dilucidar.

Así pues, el grado de evidencia actual sobre el papel de los diferentes polimorfismos del sistema renina-angiotensina en la nefropatía en diabéticos no permite concluir la existencia de una asociación, a excepción quizás del polimorfismo I/D del gen ACE. Con este trabajo se pretende aportar datos que refuercen las pruebas a favor o en contra de la asociación. Además, este estudio se centra en la contribución a la progresión de la nefropatía a través del deterioro de la función renal, un aspecto menos tratado en los trabajos publicados.

El objetivo de este trabajo fue analizar la posible asociación entre tres polimorfismos del sistema renina-angiotensina (M235T del gen del angiotensinógeno, I/D del gen de la peptidil dipeptidasa A y A1166C del gen del receptor de tipo I de la angiotensina II) y la progresión de la nefropatía en diabéticos de tipo II, utilizando la concentración sérica de creatinina como marcador de progresión.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Selección de los pacientes y recogida de la información

La fuente de los pacientes fue la población compuesta por individuos mayores de 18 años con diabetes mellitus tipo II que son atendidos en el Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de Bellvitge, con una nefropatía crónica de 2 o más años de evolución. Los criterios de exclusión fueron: a) no ser de origen caucásico, b) no superar una concentración de creatinina en suero de 200  $\mu\text{mol/L}$  en la primera visita al Servicio de Nefrología (momento en que se inicia el seguimiento).

De esta base se seleccionaron de forma aleatoria 192 individuos y se recogieron los siguientes datos de forma retrospectiva a partir de la historia clínica:

- Características demográficas: sexo y edad al inicio del seguimiento.

- Características clínicas: peso; talla; índice de masa corporal, calculado como  $\text{peso}/\text{talla}^2$ ; tiempo estimado de evolución de la diabetes; tensión arterial sistólica (TAS) y diastólica (TAD) al comienzo del seguimiento, a los seis meses, al año y a los dos años, y cálculo de las medias de los dos años de seguimiento.

- Características bioquímicas: la concentración sérica de creatinina, la fracción de hemoglobina glucosilada en sangre

(HbA<sub>1c</sub>) y la excreción de proteína en orina, todo ello medido al inicio, al año y a los dos años de seguimiento; además, de la fracción HbA<sub>1c</sub> y de la excreción de proteína en orina se calcularon las medias de los dos años de seguimiento.

El proyecto fue presentado al Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Bellvitge y aprobado por el mismo.

### Determinación de los genotipos

Se utilizó ADN genómico procedente de leucocitos de sangre periférica. La extracción de ADN se realizó mediante tubos con filtro de fibra de vidrio al que se une selectivamente el ADN, con posterior elusión mediante una solución 10mM de Tris (*High Pure™ PCR Template Preparation Kit; Roche*) a partir de 200 µL de sangre recogida en un tubo con EDTA-K<sub>3</sub>.

Los tres polimorfismos se determinaron mediante reacciones en cadena de la ADN polimerasa (PCR) y separación de fragmentos por tamaño (gen ACE) o análisis de restricción (genes AGT y ATR1). En todas ellas, la mezcla de reacción constaba de los siguientes componentes, a las concentraciones finales indicadas (en un volumen de 25 µL): MgCl<sub>2</sub> (1,5 mmol/L), KCl (50 µmol/L), Tris-HCl pH 8,30 (10 mmol/L), trifosfodesoxirribonucleótidos (dNTPs) (100 µmol/L de cada uno), los dos cebadores específicos (1 µmol/L de cada tipo) y polimerasa Taq (Roche). Como muestra de ADN se añaden unos 50 a 200 ng. En la tabla I se detallan los cebadores y las condiciones de reacción empleadas en cada una de las PCRs.

En el caso del polimorfismo M235T del gen AGT, la PCR origina un producto de 165 pb, que se digiere con la enzima Asp I (*Trh 111I*) (Roche) a 37°C durante ≥ 4h; la preparación estándar por tubo es 8,5 µL de ADN (producto de PCR), 1 µL de tampón B (10x) y 0,5 µL de Asp I. Los productos se separan por electroforesis en agarosa MetaPhor 2% (Cambrex). Si el individuo presenta una sola banda de 165 pb se identifica como MM, si presenta una sola banda de 144 pb como TT y si presenta ambas como MT (figura 1, A).

En el caso del polimorfismo I/D, se realiza una PCR (PCR 1) que produce un fragmento de 490 pb en presencia del inserto (alelo I) o de 190 pb en ausencia del inserto (alelo D). Los individuos que presentan una banda de 190 y otra de 490 pb se clasifican como heterocigotos ID (figura 1, B). Debido a la amplificación preferente del alelo D sobre el alelo I, todas las

muestras identificadas como DD se someten a una segunda amplificación específica del inserto (PCR 2). Si el resultado es una banda de 335 pb el individuo se reclasifica como ID y si la banda está ausente se confirma como DD.

Para el polimorfismo A1166C del gen ATR1, la PCR origina un producto de 1618 pb, que se digiere con la enzima Dde-1 (Roche) a 37°C durante ≥ 12h; la preparación estándar por tubo es 20 µL de ADN (producto de PCR), 2,2 µL de tampón H (10x) y 0,3 µL de Dde-1. El individuo que presenta bandas de 602 y 560 pb se identifica como AA, si presenta bandas de 602, 417 y 143 pb como CC y si presenta bandas de los cuatro tamaños como AC (figura 1, C).

### Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas estadísticos SPSS y PopGene, y se consideró significativa una p<0,05. Los datos se presentan con la media y la desviación estándar (DE) o bien con la mediana y el intervalo intercuartílico, según la distribución se ajustase o no a una función normal. La evolución de las magnitudes clínicas y bioquímicas en los dos años de seguimiento se evaluó mediante las pruebas de t Student apareado o Wilcoxon apareado. La comparación de las magnitudes demográficas, clínicas y bioquímicas entre genotipos se hizo mediante la prueba  $\chi^2$ , ANOVA o Kruskal-Wallis, y la comparación de los incrementos de la concentración sérica de creatinina entre genotipos mediante Kruskal-Wallis. La influencia de factores de confusión se estudió mediante el coeficiente de correlación de Spearman y la posible confusión se controló mediante un análisis de regresión lineal múltiple.

## RESULTADOS

### Descripción de la población

Los individuos que se han estudiado en el presente trabajo eran todos diabéticos tipo II, padecían una nefropatía crónica de al menos dos años de evolución pero no superaban una concentración de creatinina en suero de 200 µmol/L en la primera visita al Servicio de Nefrología (momento en que se inicia el seguimiento). Estaban sometidos a tratamientos farmacológicos con hipoglucemiantes y uno o más fármacos antihipertensivos, mayoritariamente inhibidores de la peptidil dipeptidasa A o antagonistas del receptor de la angiotensina II,

**Tabla I.** Cebadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa y condiciones de reacción.

Gen y polimorfismo	Secuencia de los cebadores	Condiciones de reacción
AGT M235T	5'- CCG TTT GTG CAG GGC CTG GCT CTC T -3' 5'- CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CCC C -3'	30x (94°C 45 s, 68°C 1 min, 72°C 1 min)
ACE I/D (PCR 1)	5'- CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT -3' 5'- GAT GTG GCC ATC ACA TTG GTC AGA T -3'	35x (94°C 45 s, 60°C 1 min, 60°C 1 min)
ACE I/D (PCR 2)	5'-TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC -3' 5'-TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA -3'	35x (94°C 45 s, 65°C 1 min, 72°C 1 min)
ATR1 A1166C	5'- AAA TGC TTG TAG CCA AAG TCA CCT -3' 5'- TTC ATA CTC ATT CAA GGT AGT CT -3'	30x (94°C 45 s, 63°C 1 min, 72°C 1 min)

En el caso del gen AGT, uno de los cebadores tiene dos bases no apareadas (bases subrayadas), que se emplean con tal de introducir una diana de restricción para la enzima Asp I.

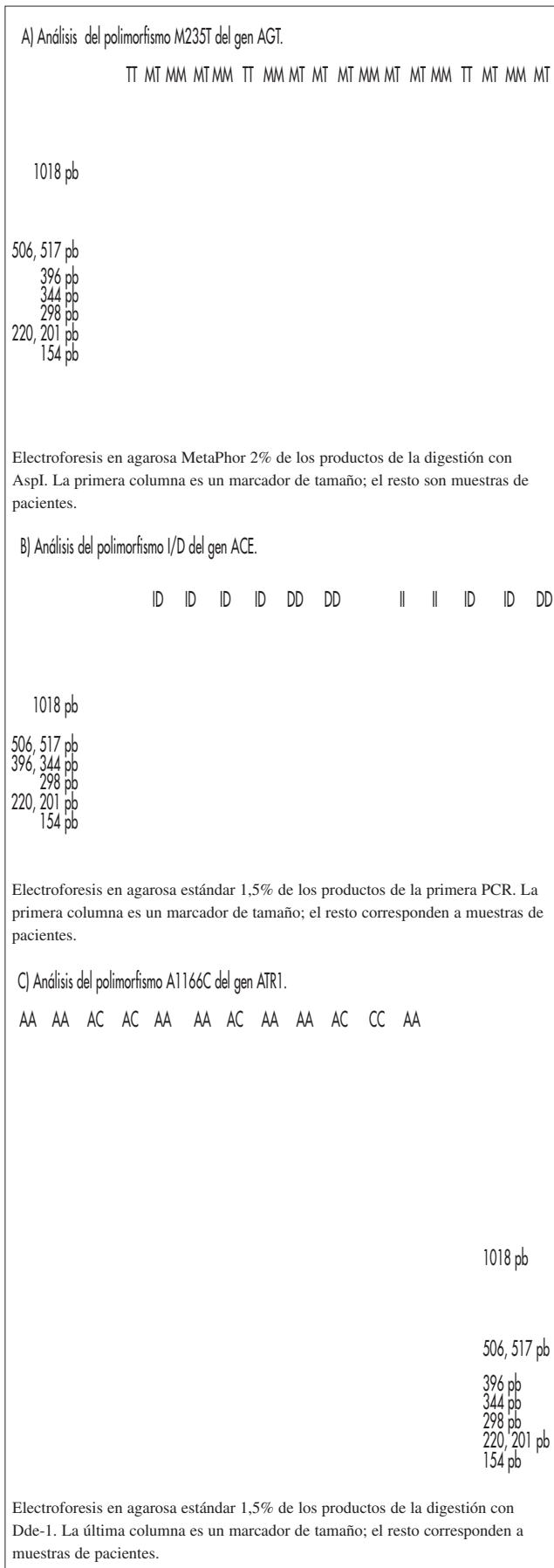


Figura 1

con el objetivo de mantener una presión arterial por debajo de los 130/85 mmHg.

El grupo de estudio definitivo lo formaron 192 individuos. Sus características demográficas, clínicas y bioquímicas al comienzo del estudio se recogen en la tabla II. Se observa un número de varones algo superior al de mujeres y una cierta obesidad; la media de edad se sitúa en los 61 años y la mediana del tiempo de evolución de la diabetes en los 10 años; la excreción de proteína entra en el rango de la proteinuria, aunque con una gran dispersión de valores, la media de la fracción de HbA<sub>1c</sub> se mantiene ligeramente por encima del objetivo del 7% de la *American Diabetes Association* y los valores de la presión arterial sistólica y diastólica son indicativos de hipertensión.

**Evolución de las magnitudes clínicas y bioquímicas en la población**

Se examinó cómo variaron en los dos años de seguimiento la concentración sérica de creatinino, la excreción de proteína en orina, la fracción de HbA<sub>1c</sub> en sangre y las tensiones arteriales sistólica y diastólica. Para ello, de cada individuo, se recogieron y se compararon los valores iniciales y a los dos años del seguimiento. El análisis estadístico reveló un aumento significativo de la concentración de creatinino, indicativo de progresión de la nefropatía, que si lo cuantificamos con medianas representó un cambio de 108 μmol/L a 122 μmol/L. La excreción de proteína también aumentó de forma significativa, de 0,85 a 1,17 g/24 h (medianas), mientras que las tensiones arteriales sistólica y diastólica disminuyeron, de 159/82 a 154/78 mm Hg (medias), seguramente por la optimización de un tratamiento antihipertensivo. Por su parte, la fracción de HbA<sub>1c</sub> en sangre no experimentó una variación estadísticamente significativa entre el comienzo y el final del seguimiento. Estos datos se resumen en la tabla III.

**Frecuencias genotípicas**

Las frecuencias genotípicas de los polimorfismos de los genes AGT, ACE y ATR1 se muestran en la tabla IV. Las proporciones se hallan en equilibrio de Hardy-Weinberg y son muy similares a las publicadas para la población caucásica con nefropatía (13,14).

Tabla II. Características iniciales de la población.

Magnitud	Todos los pacientes (n=192)
Sexo (% varones)	57%
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	30,0 (DE=4.6)
Tiempo de evolución de la DM (años)	10 (3-18)
Edad al inicio del seguimiento (años)	61 (DE=10)
Concentración basal de creatinino sérico (μmol/L)	108 (88-138)
Excreción basal de proteína en orina (g/24 h)	0,85 (0.28-2.23)
Fracción de HbA <sub>1c</sub> basal (%)	7,4 (DE=1.7)
TAS basal (mm Hg)	159 (DE=27)
TAD basal (mm Hg)	82 (DE=13)

El sexo se expresa en % de varones. Las variables cuantitativas que siguen una distribución normal se expresan como medias acompañadas por las desviaciones estándar (DE); en caso contrario, como medianas acompañadas por los intervalos intercuartílicos.

**Tabla III.** Evolución de las magnitudes bioquímicas en la población.

Magnitud	Tiempo		P
	Basal	2 años	
Concentración basal de creatinina sérica ( $\mu\text{mol/L}$ )	108 (88-138)	122 (94-160)	<0,001 <sup>1</sup>
Excreción basal de proteína en orina (g/24 h)	0,85 (0,28-2,23)	1,17 (0,44-2,85)	0,035 <sup>1</sup>
Fracción de HbA <sub>1c</sub> basal (%)	7,4 (DE=1,7)	7,6 (DE=1,4)	0,147 <sup>2</sup>
TAS basal (mm Hg)	159 (DE=28)	154 (DE=25)	0,022 <sup>2</sup>
TAD basal (mm Hg)	82 (DE=12)	78 (DE=12)	<0,001 <sup>2</sup>

Los datos se expresan como medias acompañadas por las desviaciones estándar o bien como medianas y sus correspondientes intervalos intercuartílicos. <sup>1</sup> Wilcoxon apareado, <sup>2</sup> t Student apareado.

### Relación de los polimorfismos del sistema renina-angiotensina con la progresión de la nefropatía

De cada uno de los genes se establecieron tres grupos en función del genotipo (MM, MT y TT para ATG; DD, ID y II para ACE; y AA, AC y CC para ATR1). Para examinar si entre los grupos existía homogeneidad en aquellas magnitudes que podían influir en la progresión de la nefropatía, se compararon las variables siguientes: el número de varones, el índice de masa corporal, el tiempo de evolución de la diabetes, la edad al inicio del seguimiento, la concentración basal de creatinina sérica y las medias de los dos años de seguimiento de la excreción de proteína en orina, de la fracción de HbA<sub>1c</sub> en sangre y de las tensiones arteriales sistólica y diastólica (calculadas con los valores al inicio, a los seis meses, al año y a los dos años del seguimiento). Los datos se muestran en las tablas V, VI y VII. Para el gen ACE, los grupos eran homogéneos en todas las variables consideradas, pero para AGT y ATR1 la comparación entre los genotipos reveló diferencias significativas en la concentración basal de creatinina, siendo el genotipo TT, en el caso de AGT, y el AC, en el caso de ATR1, los que mostraban valores inferiores al resto.

De cada uno de los genotipos se calcularon los incrementos de las concentraciones de creatinina experimentados en los dos años y se compararon entre sí (tabla VIII). Los análisis no revelaron diferencias significativas en los incrementos entre los genotipos de ACE, AGT ni ATR1, de modo que no apoyan la hipótesis de la existencia de asociación entre dichos polimorfismos y la progresión de la nefropatía. De forma visual, los incrementos en la concentración de creatinina correspondientes a cada genotipo se muestran en la figura 2 (se han representado las medianas).

#### Ajuste de la relación de la nefropatía y los polimorfismos genéticos por los factores de confusión

Puesto que un análisis bivalente como el anterior no tiene en cuenta la existencia de otras variables que pueden tener efecto en la progresión de la nefropatía y puesto que existe cierta heterogeneidad entre los genotipos (por lo menos, entre los genotipos de AGT y ATR1, en la concentración inicial de creatinina en suero), los resultados del estudio anterior no son del todo concluyentes y podría ser que la influencia de estas variables hubiera enmascarado un verdadero efecto de los polimorfismos genéticos sobre la nefropatía. Por ello se realizó un análisis de regresión lineal múltiple en el que se incluyeron como covariables las magnitudes que aparecían correlacionadas con el incremento en dos años en la concentración sérica de creatinina: el tiempo de evolución de

**Tabla IV.** Frecuencias genotípicas de M235T de AGT, I/D de ACE y A1166C de ATR1 en la población.

Gen	Genotipo	Frecuencia (%)	P
AGT	MM	34	0,912
	MT	48	
	TT	18	
ACE	DD	36	0,581
	ID	46	
	II	17	
ATR1	AA	57	0,912
	AC	36	
	CC	7	

la diabetes, la concentración basal de creatinina en suero, la excreción de proteína media en los dos años y la presión arterial sistólica media de los dos años (tabla IX). El análisis estadístico ajustado por estas variables tampoco reveló la existencia de asociación entre los polimorfismos de AGT, ACE y ATR1 y la progresión de la nefropatía.

## DISCUSIÓN

En este estudio hemos pretendido analizar si tres polimorfismos genéticos del sistema renina-angiotensina (M235T de AGT, I/D de ACE y A1166C de ATR1) tienen alguna influencia en la progresión de la nefropatía en una población de diabéticos tipo II. Para ello hemos realizado, para cada uno de los polimorfismos, un estudio longitudinal de cohortes retrospectivo, donde la evolución de la enfermedad se ha evaluado mediante el incremento en la concentración sérica de creatinina experimentado en dos años. La implicación del sistema renina-angiotensina tiene un fundamento biológico, ya que su activación puede originar, a través de la doble acción vasoconstrictora y trófica de la angiotensina II, hipertensión glomerular y sistémica y alteraciones estructurales en el riñón.

Hemos trabajado con pacientes que partían de una condición de nefropatía establecida (con presencia de proteinuria) sin insuficiencia renal o con insuficiencia renal incipiente (no superaban una concentración de creatinina en suero de 200  $\mu\text{mol/L}$ ). En esta fase de la enfermedad, la velocidad del deterioro de la función renal es lenta, por lo que los incrementos en la concentración sérica de creatinina en dos años que se esperan observar no han de ser muy grandes. Tampoco lo habrán de ser, pues, las diferencias entre los genotipos, teniendo

**Tabla V.** Características de los individuos según el genotipo de AGT

Magnitud	Genotipo			P
	MM (n=65)	MT (n=93)	TT (n=34)	
Sexo (% varones)	55%	62%	47%	0,285 <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	29,8 (DE=4,9)	30,3 (DE=4,8)	30,0 (DE=3,1)	0,749 <sup>2</sup>
Tiempo de evolución de la DM (años)	11 (DE=10)	12 (DE=10)	11 (DE=9)	0,937 <sup>2</sup>
Edad al inicio del seguimiento (años)	62 (DE=9)	62 (DE=10)	59 (DE=10)	0,253 <sup>2</sup>
Concentración basal de creatinino sérico (μmol/L)	108 (90-139)	114 (90-140)	92 (75-129)	0,036 <sup>3</sup>
Excreción de proteína urinaria media (g/24 h)	1,10 (0,34-2,58)	1,18 (0,34-2,98)	0,63 (0,21-1,63)	0,111 <sup>3</sup>
Fracción de HbA <sub>1c</sub> media (%)	7,3 (DE=1,4)	7,6 (DE=1,4)	7,3 (DE=1,4)	0,287 <sup>2</sup>
TAS media (mm Hg)	155 (DE=19)	155 (DE=20)	154 (DE=21)	0,989 <sup>2</sup>
TAD media (mm Hg)	78 (DE=11)	80 (DE=9)	80 (DE=11)	0,590 <sup>2</sup>

Los datos se expresan como medias acompañadas por las desviaciones estándar o bien como medianas y sus correspondientes intervalos intercuartílicos. <sup>1</sup> test de  $\chi^2$ ,

<sup>2</sup> ANOVA, <sup>3</sup> test de Kruskal-Wallis.

**Tabla VI.** Características de los individuos según el genotipo de ACE

Magnitud	Genotipo			P
	DD (n=70)	ID (n=89)	II (n=33)	
Sexo (% varones)	59%	57%	55%	0,929 <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	30,2 (DE=4,7)	30,0 (DE=4,4)	29,6 (DE=4,7)	0,832 <sup>2</sup>
Tiempo de evolución de la DM (años)	13 (DE=10)	11 (DE=10)	10 (DE=8)	0,249 <sup>2</sup>
Edad al inicio del seguimiento (años)	62 (DE=11)	61 (DE=10)	61 (DE=7)	0,784 <sup>2</sup>
Concentración basal de creatinino sérico (μmol/L)	106 (87-138)	114 (91-139)	98 (84-137)	0,313 <sup>3</sup>
Excreción de proteína urinaria media (g/24 h)	0,82 (0,34-2,21)	1,18 (0,29-2,45)	1,19 (0,26-2,68)	0,891 <sup>3</sup>
Fracción de HbA <sub>1c</sub> media (%)	7,6 (DE=1,5)	7,2 (DE=1,4)	7,4 (DE=1,2)	0,199 <sup>2</sup>
TAS media (mm Hg)	156 (DE=19)	157 (DE=22)	160 (DE=16)	0,497 <sup>2</sup>
TAD media (mm Hg)	78 (DE=9)	80 (DE=10)	80 (DE=11)	0,534 <sup>2</sup>

Los datos se expresan como medias acompañadas por las desviaciones estándar o bien como medianas y sus correspondientes intervalos intercuartílicos. <sup>1</sup> test de  $\chi^2$ ,

<sup>2</sup> ANOVA, <sup>3</sup> test de Kruskal-Wallis.

do en cuenta además el carácter poligénico de la enfermedad y el hecho de que los pacientes están sometidos a tratamientos farmacológicos que pueden atenuar las diferencias debidas a los polimorfismos.

En nuestro estudio, los incrementos en la concentración de creatinino experimentados por cada genotipo en los dos años de seguimiento son pequeños y las diferencias entre ellos no significativas. Para AGT, es el genotipo TT el que experimenta un menor incremento, aunque parte de una concentración de creatinino menor que el resto de genotipos; para ACE, es el

genotipo II el que experimenta un incremento menor (aunque tampoco estadísticamente significativo); y para ATR1, los genotipos AC y CC muestran los menores incrementos, aunque se ha de tener en cuenta que los individuos AC parten de concentraciones de creatinino más bajas. Para eliminar la posible confusión de la concentración inicial de creatinino y de otras variables que tienen relación con el incremento en la concentración de creatinino (tiempo de evolución de la diabetes, excreción de proteína urinaria media de dos años y presión arterial sistólica media de dos años), se realizó un análisis de

**Tabla VII.** Características de los individuos según el genotipo de ATR1.

Magnitud	Genotipo			P
	AA (n=110)	AC (n=70)	CC (n=12)	
Sexo (% varones)	56%	57%	67%	0,793 <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	29,7 (DE=4,1)	30,3 (DE=5,2)	30,2 (DE=4,3)	0,669 <sup>2</sup>
Tiempo de evolución de la DM (años)	11 (DE=10)	12 (DE=10)	8 (DE=6)	0,437 <sup>2</sup>
Edad al inicio del seguimiento (años)	62 (DE=10)	61 (DE=10)	60 (DE=10)	0,803 <sup>2</sup>
Concentración basal de creatinino sérico (μmol/L)	114 (90-145)	98 (87-134)	118 (98-148)	0,049 <sup>3</sup>
Excreción de proteína urinaria media (g/24 h)	0,92 (0,29-2,00)	1,00 (0,34-2,68)	2,23 (0,13-2,73)	0,728 <sup>3</sup>
Fracción de HbA <sub>1c</sub> media (%)	7,4 (DE=1,5)	7,5 (DE=1,3)	7,0 (DE=1,1)	0,537 <sup>2</sup>
TAS media (mm Hg)	156 (DE=20)	153 (DE=20)	151 (DE=20)	0,558 <sup>2</sup>
TAD media (mm Hg)	79 (DE=10)	79 (DE=9)	80 (DE=11)	0,699 <sup>2</sup>

Los datos se expresan como medias acompañadas por las desviaciones estándar o bien como medianas y sus correspondientes intervalos intercuartílicos. <sup>1</sup> test de  $\chi^2$ , <sup>2</sup> ANOVA, <sup>3</sup> test de Kruskal-Wallis.

**Tabla VIII.** Incremento en las concentraciones de creatinino en los dos años del seguimiento.

Gen	Genotipo	Incremento de creatinino a los dos años (μmol/L)	P
AGT	MM (n=65)	11	0,175 <sup>1</sup>
	MT (n=93)	10	
	TT (n=34)	4	
ACE	DD (n=70)	9,5	0,810 <sup>1</sup>
	ID (n=89)	9	
	II (n=33)	6	
ATR1	AA (n=110)	10,5	0,588 <sup>1</sup>
	AC (n=70)	7	
	CC (n=12)	7	

Los datos se expresan en medianas. <sup>1</sup> Test de Kruskal-Wallis.

regresión multivariante, en el que los datos tampoco apoyaron la hipótesis de asociación entre los polimorfismos genéticos y la progresión de la nefropatía.

En estudio preliminar realizado por nuestro propio grupo con 80 individuos diabéticos, que presentamos en el XXII Congreso Nacional de la SEQC de 2003, obtuvimos unos resultados que indicaban la existencia de diferencias significativas en el incremento de creatinino entre los genotipos de ATR1. En concreto, los individuos AA mostraban un incremento mayor al experimentado por los AC o CC, en el grupo que considerábamos que partía de una insuficiencia renal incipiente. Esos resultados creemos que podían estar sesgados debido a la falta de homogeneidad en las condiciones basales entre los diferentes genotipos de ATR1, especialmente en la concentración inicial de creatinino, a pesar de que habíamos hecho una estratificación de los individuos en dos grupos atendiendo a esta característica. El problema de la falta de homo-

**Tabla IX.** Correlación del incremento en la concentración de creatinino y las magnitudes con posible influencia en la nefropatía.

Magnitud	Coefficiente de correlación de Spearman	P
Sexo (% varones)	-0,029	0,693
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0,011	0,886
Tiempo de evolución de la DM (años)	0,245	0,001
Edad al inicio del seguimiento (años)	0,096	0,219
Concentración basal de creatinino sérico (μmol/L)	0,149	0,038
Excreción de proteína urinaria (g/24 h)	0,445	<0,001
Fracción de HbA <sub>1c</sub> media (%)	0,072	0,321
TAS media (mm Hg)	0,290	<0,001
TAD media (mm Hg)	-0,030	0,683

geneización se ha minimizado en el estudio actual al aumentar el número de individuos, no estratificar la población en dos grupos en función de la concentración inicial de creatinino y considerando las posibles variables de confusión.

Si hacemos un repaso a la bibliografía existente sobre la relación de los polimorfismos de los genes del sistema renina-angiotensina y la nefropatía diabética, pueden señalarse tres líneas de investigación: la posible contribución de dichos polimorfismos a la susceptibilidad de la enfermedad, a la progresión hacia la insuficiencia renal una vez aparecida la enfermedad y a la susceptibilidad a los agentes terapéuticos empleados en este tipo de enfermos (inhibidores de la peptidil dipeptidasa A y antagonistas de la angiotensina II).

La relación de estos polimorfismos con la susceptibilidad de la nefropatía se ha analizado, en una primera aproximación,

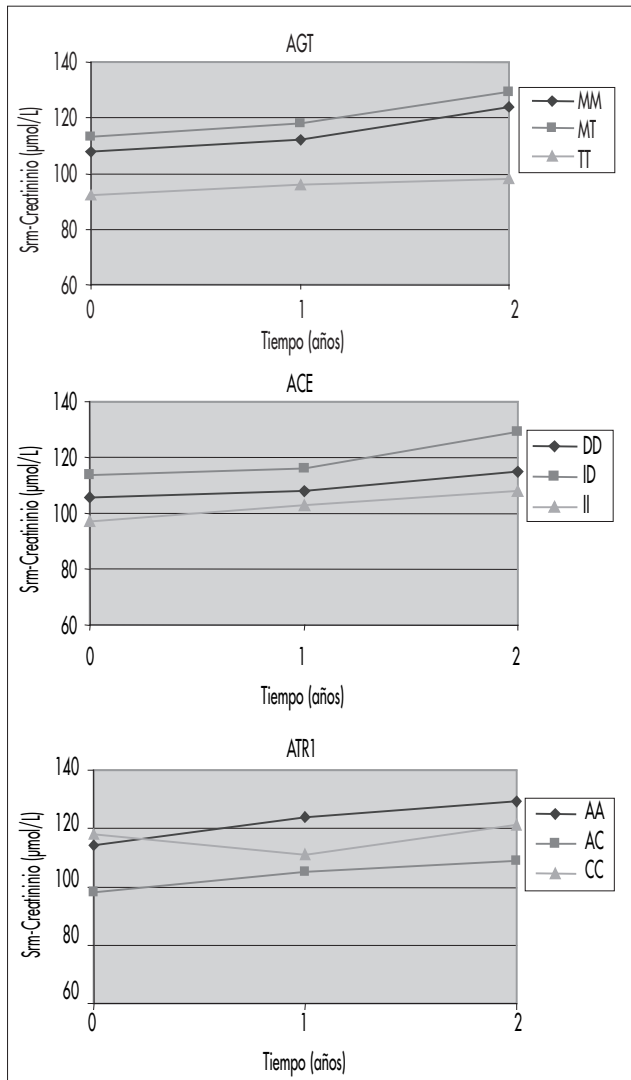


Figura 2 Evolución de la concentración de creatinino por genotipos.

con diseños transversales, donde se comparan las frecuencias genotípicas entre los individuos con y sin la enfermedad. Pero este tipo de estudios puede resultar sesgado ya que se sabe que las variantes alélicas implicadas en el desarrollo de la nefropatía pueden afectar la supervivencia del paciente (contribuyendo a la mortalidad cardiovascular), lo que haría disminuir su representación entre los individuos con nefropatía (15). Los estudios más adecuados son los que tienen en cuenta el tiempo (casos y controles o cohortes). Los primeros trabajos centrados en el estudio de la susceptibilidad fueron, para el polimorfismo I/D de ACE, los de Marré (13) y Doria (14), ambos de 1994; para M235T de AGT, el de Tarnow (16), Doria (17) y Fogarty (11), todos de 1996, y el de Ringel, de 1997 (18); y para A1166C de ATR1, los de Tarnow (19), Chowdhury (20) y Doria (21), de 1996 y 1997.

El primer trabajo de Marré (13) desveló que, en pacientes con diabetes mellitus tipo I, la presencia del alelo D se asociaba al desarrollo de la nefropatía diabética. Sin embargo, investigadores posteriores no pudieron confirmar los resultados (22, 23). Para lograr una visión global, se llevaron a cabo varios metaanálisis y revisiones, entre los que destacan el de Fujisawa (5) y el de Kunz (6), ambos de 1998. El primero,

que engloba diabéticos tipo I y tipo II, concluye que existe un incremento del riesgo de padecer nefropatía en los sujetos con alelo D frente a los que no lo poseen, con una razón de odds de 1,32 (IC 95% entre 1,15 y 1,51); también los análisis por separado de diabéticos tipo I y tipo II dan asociaciones significativas. Por su parte, el trabajo de Kunz sólo demuestra la existencia de asociación entre el polimorfismo I/D y la nefropatía diabética en la población asiática (razón de odds de 1,88, con un IC 95% entre 1,42 y 2,85) y no en la población caucásica (razón de odds de 1,10, con un IC 95% entre 0,83 y 1,45).

Sobre el polimorfismo M235T del gen AGT, Tarnow (16), Doria (17) y Ringel (18) no vieron una asociación entre la variante alélica T y la susceptibilidad a la nefropatía diabética, a pesar de su implicación bastante clara en la hipertensión arterial (10). El trabajo de Fogarty (11), en cambio, concluía que existía una asociación directa entre dicho polimorfismo y la nefropatía diabética.

En cuanto al polimorfismo A1166C del gen ATR1, Tarnow (19) y Chowdhury (20) no pudieron demostrar su relación con el incremento del riesgo de nefropatía diabética. Doria (21), sin embargo, informó de la existencia de un aumento del riesgo cuando la variante C se acompañaba de un mal control glucémico.

Los trabajos que examinan el papel de estos polimorfismos en la progresión de la nefropatía diabética, o bien comparan las frecuencias alélicas entre los diferentes estadios de la nefropatía, o bien analizan el tiempo que transcurre hasta alcanzar el estadio de insuficiencia renal terminal o hasta superar una concentración de creatinino en suero (estudios de supervivencia). Destacan los estudios de cohortes prospectivos y multicéntricos de Marré (7) y de Hadjadj (8). El primero examina la participación de los genes de ACE, AGT y ATR1 en la susceptibilidad y progresión de la nefropatía diabética en diabéticos tipo I, y llega a las siguientes conclusiones: la severidad del daño renal se asocia al polimorfismo I/D de ACE; el alelo T de AGT no es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la nefropatía y su progresión, pero sí estaría asociado a un incremento del riesgo si se presenta con el alelo D; por su parte, el polimorfismo de ATR1 no tendría ningún efecto sobre la progresión de la nefropatía. El trabajo de Hadjadj, que examina únicamente el polimorfismo I/D de ACE, concluye que el alelo D aumenta el riesgo de desarrollar nefropatía diabética y de que esta progrese en los diabéticos tipo I con mal control glucémico.

La línea de investigación más reciente trata de determinar si los polimorfismos de ACE, AGT y ATR1 proporcionan una diferente susceptibilidad a la respuesta a los tratamientos con inhibidores de la peptidil dipeptidasa A (IECAs) o con antagonistas del receptor de la angiotensina II (ARA II). Un estudio de observación de 7 años llevado a cabo por investigadores del *Steno Diabetes Center* con diabéticos tipo I con nefropatía diabética tratados con IECAs, demostró que los individuos con genotipo DD tenían una descenso del caudal de filtrado glomerular más rápido que los sujetos ID o II (24). Un trabajo posterior de este mismo grupo, que estudia la susceptibilidad del polimorfismo I/D a la respuesta, esta vez a los ARA II, concluye que la progresión de la nefropatía diabética es similar en los tres genotipos de ACE (25).

Según los datos de nuestro trabajo, y teniendo en cuenta la bibliografía existente, desde el punto de vista clínico, se puede concluir que, actualmente, el papel que representan los polimorfismos de ACE, AGT y ATR1 en el desarrollo y



progresión de la nefropatía en los diabéticos es todavía incierto. Si el mal control metabólico o de la presión sanguínea son factores conocidos que implican un mayor aumento del riesgo de progresión hacia un estadio más avanzado de la nefropatía, se necesita continuar investigando cuál es el papel que desempeña la constitución genética. Los trabajos que se lleven a cabo deben tener en cuenta el carácter poligénico de la nefropatía y el hecho de que la contribución de cada uno de los genes implicados es muy pequeña, por lo que necesitarán trabajar con muestras grandes para lograr suficiente potencia estadística. También es necesario que los seguimientos sean a largo plazo, seguramente superiores al período de dos años que nosotros hemos considerado, teniendo en cuenta que la progresión de la nefropatía se ve retardada por el buen control glucémico y de la presión arterial, y trabajar con un marcador sensible de la progresión de la enfermedad, como es la tasa de filtración glomerular. Por último, se debe poner especial atención a la interacción entre genes pues, como sugieren algunos datos, puede ser importante en el desarrollo y progresión de la enfermedad.

Correspondencia:  
Patricia Calzada Lladó  
Psg de la Creu, 35, 2-1  
Sant Cugat del Vallès (Barcelona)  
e-mail: patriciacalzada@telefonica.net

## BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Susztak K, Sharma K, Schiffer M, Mccue P, Ciccone E, Böttinger EP. Genomic Strategies for Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:S271-S278.
3. Leechey DJ, Singh AK, Alavi N, Singh R. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney International* 2000; 58 (Supl 77):S93-S98.
4. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphisms in angiotensin I converting enzyme gene accounting for half of the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86:1343-1346.
5. Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, Hamada Y, Ueda H, Shintani M, et al. Meta-analysis of association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme gene with diabetic nephropathy and retinopathy. *Diabetologia* 1998; 41:47-53.
6. Kunz R, Bork J, Fritsche L, Ringel J, Sharma AM. Association between the angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism and diabetic nephropathy: a methodologic appraisal and systematic review. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:1653-1663.
7. Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier Y, Chatellier G, Sert C et al (Génétique de la Néphropathie Diabétique Study Group). Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin-systems to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1997; 99:1585-1589.
8. Hadjadj S, Belloum R, Bouhanick B, Gallois Y, Guilloteau G, Chatellier G, et al. Prognostic value of angiotensin-I converting enzyme I/D polymorphism for nephropathy in type I diabetes mellitus: A prospective study. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:541-549.
9. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev Y, Lifton R, Williams C, Charru A, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71: 169-180.
10. Kunz R, Kreutz R, Beige J, Distler A, Sharma AM. Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites: A systematic review and methodological appraisal. *Hypertension* 1997; 30:1331-1337.
11. Fogarty DG, Haron JC, Hughes AE, Nevin NC, Doherty CC, Maxwell AP. A molecular variant is associated with diabetic nephropathy in IDDM. *Diabetes* 1996; 45:1204-1208.
12. Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Ferry I, Charu A, Clauser E, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism in human essential hypertension. *Hypertension* 1994; 24:63-69.
13. Marré M, Bernadet P, Gallois Y, Savagner F, Guyene TT, Hallab M et al. Relationships between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels and diabetic retinal and renal complications. *Diabetes*, 1994; 43:384-388.
14. Doria A, Warram JH, Krolewski AS. Genetic predisposition to diabetic nephropathy: evidence for a role of the angiotensin I converting enzyme gene. *Diabetes*, 1994; 43:690-695.
15. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature (Lond.)*, 1992; 359:641-644.
16. Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Nielsen F, Hansen B, Ricard S. et al. Angiotensinogen gene polymorphisms in IDDM patients with diabetic nephropathy. *Diabetes* 1996; 45:367-369.
17. Doria A, Onuma T, Gearin G, Freire M, J Warram, A Krolewski. Angiotensinogen polymorphism M235T, hypertension and nephropathy in insulin-dependent diabetes. *Hypertension*, 1996; 27:1134-1139.
18. Ringel J, Beige J, Kunz R, Distler A, Sharma AM. Genetic variants of the renin-angiotensin system, diabetic nephropathy and hypertension. *Diabetologia*, 1997; 40 (2):193-199.
19. Tarnow L, Cambien F, Rossing P et al. Angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphism and diabetic microangiopathy. *Nephrol Dial Transplant*, 1996; 11:1019-1023.
20. Chowdhury TA, Dyer PH, Kumar S et al. Lack of association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with diabetic nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med*, 1997; 14:837-840.
21. Doria A, Onuma T, Warram JH, Krolewski AS. Synergistic effect of angiotensin II type 1 receptor genotype and poor glycemic control on risk of nephropathy in IDDM. *Diabetologia*; 1997; 40:1293-1299.
22. Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Nielsen FS, Hansen BV, Lecerf L et al. Lack of relationship between an insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene and diabetic nephropathy and proliferative retinopathy in IDDM patients. *Diabetes*, 1995; 44:489-494.
23. Chowdhury TA, Dronsfield MJ, Kumar S, SLC Gough, Gibson SP, Khatoun A et al. Examination of two genetic polymorphisms within the rennin-angiotensin system: no evidence for an association with nephropathy. *Diabetologia*, 1995; 39:1108-114.
24. Parving HH, Jacobson P, Tarnow L, Rossing P, Lecerf L, Poirier O. Effect of deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene on progression of diabetic nephropathy during inhibition of angiotensin converting enzyme: observational follow-up study. *BMJ*, 1996; 313:591-594.
25. Andersen S, Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Juhl TR, Deinum J et al. Long-term renoprotective effects of losartan in diabetic nephropathy: interaction with ACE insertion/deletion genotype? *Diabetes Care* 2003; 26:1501-1506.