

VÂNIA PERETTI DE ALBUQUERQUE WOBETO

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DA HAPTOGLOBINA
NA RETINOPATIA DIABÉTICA EM UMA AMOSTRA DA
POPULAÇÃO BRASILEIRA**

CAMPINAS

2007

VÂNIA PERETTI DE ALBUQUERQUE WOBETO

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DA HAPTOGLOBINA
NA RETINOPATIA DIABÉTICA EM UMA AMOSTRA DA
POPULAÇÃO BRASILEIRA**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em
Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA DE FÁTIMA SONATI

CAMPINAS

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

W813i Wobeto, Vânia Peretti de Albuquerque
“Influência do polimorfismo da haptoglobina na retinopatia diabética em uma amostra da população brasileira” / Vânia Peretti de Albuquerque Wobeto. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Maria de Fátima Sonati
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Haptoglobinas. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Diabetes Mellitus. 4. Retinopatia diabética. I. Sonati, Maria de Fátima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : “Haptoglobin polymorphism and diabetic retinoplasthy in a brazilian population”

Keywords: • Haptoglobins
• Genetic Polymorphism
• Diabetes Mellitus
• Diabetic retinopathy

Área de concentração : Ciências Biomédicas

Titulação: Mestrado em Ciências Médicas

**Banca examinadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati
Profa. Dra. Elaine Maria Frade Costa
Prof Dr José Paulo Cabral de Vasconcellos**

Data da defesa: 12-02-2007

Financial support was provided by FAPESP/Brazil (grants n.05/02383-8 and 03/09458-8).

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria de Fátima Sonati

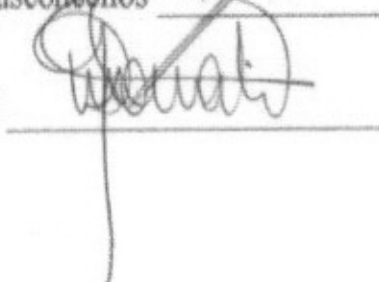
Prof. (a) Dr. (a) Elaine Maria Frade Costa



Prof. (a) Dr. (a) José Paulo Cabral de Vasconcellos



Prof. (a) Dr. (a) Maria de Fátima Sonati



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/02/2007

200730512

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Dóra e Armando (“in memorian”),
pelo apoio, dedicação, incentivo e por acreditarem
em meus sonhos.*

A Deus, que é vida e luz no meu caminho.

Ao meu esposo Rudimar e aos meus filhos, Rodrigo e William, pelo amor, paciência, compreensão e incentivo no decorrer deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati, pela orientação, dedicação, paciência, apoio e compreensão na realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos, Profa. Dra. Elaine Maria Frade Costa e Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta, pelas sugestões, correções e críticas que enriqueceram esta tese.

À Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo, pela importante colaboração, e ao Prof. Dr. Carlos Steiner e Dra. Nilma Assis, por fornecerem parte das amostras de pacientes utilizadas neste trabalho.

À Cleide A. M. Silva, da Assessoria de Estatística da Câmara de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, pela realização das respectivas análises.

À amiga Tânia Regina Zaccariotto, pela valiosa colaboração em várias etapas deste trabalho.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação e do Laboratório de Hemoglobinopatias, pela saudável convivência e amizade.

Aos pacientes do HC da UNICAMP e da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

À FAPESP, pelo suporte financeiro ao projeto.

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xi</i>
ABSTRACT	<i>xii</i>
1- INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1- A Haptoglobina	16
1.2- Estrutura Protéica da Haptoglobina	17
1.3- Os Genes da Haptoglobina	18
1.4- O Gene Hpr	20
1.5- O Alelo HP0 e Variantes Estruturais	21
1.6- Distribuição Geográfica	23
1.7- Propriedades Funcionais da Haptoglobina	23
1.8- Estudos Realizados na População Brasileira	27
1.9- O Polimorfismo da Haptoglobina e Complicações Vasculares em Pacientes com Diabetes Mellitus	28
2- OBJETIVOS	33
3- CAPÍTULO 1- “Haptoglobin polymorphism and diabetic retinopathy in brazilian patients”	35
4- DISCUSSÃO	47
5- CONCLUSÕES	55
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
7- ANEXOS	65
ANEXO 1- Dados estatísticos utilizados para elaboração do manuscrito	66

ANEXO-2- Avaliação das frequências genotípicas segundo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	73
ANEXO-3- Modelo Geral do Termo de Consentimento e Pareceres do Comitê de Ética/FCM/UNICAMP e do CONEP.....	75
ANEXO-4- Artigo de revisão a ser submetido à publicação.....	79

ADA	Associação Americana de Diabetes
CK II	Quinase caseína II
DM	Diabetes mellitus
DM-1	Diabetes mellitus tipo 1
DM-2	Diabetes mellitus tipo 2
DP	Desvio padrão
GC	Grupo controle
Hb	Hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HIV	Vírus da imunodeficiência humana adquirida
HO	Heme-oxigenase
HP	Alelo Haptoglobina
Hp	Haptoglobina
Hp^{Del}	Deleção do gene da haptoglobina
Hpr	<i>Haptoglobin- related protein</i>
HPr	Gene relacionado à haptoglobina
IC	Intervalo de confiança
IFN-γ	Interferon γ
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5

IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeos
OD	<i>Odds ratio</i>
PAS	Pressão arterial sistêmica sistólica
PAD	Pressão arterial sistêmica diastólica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RD	Retinopatia diabética
RDNP	Retinopatia diabética não proliferativa
RDP	Retinopatia diabética proliferativa
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral α

	<i>Pág.</i>
Figura 1- Representação esquemática das diferentes estruturas protéicas correspondentes aos três fenótipos da Hp.....	18
Figura 2- Representação esquemática da estrutura dos genes da Hp.....	20
Figura 3- Representação esquemática da deleção HpDel.....	22
Figura 4- Representação esquemática da endocitose do complexo Hp-Hb pelo macrófago.....	25



RESUMO

A haptoglobina (Hp) é uma proteína de fase aguda que possui propriedades antioxidantes e imunomodulatórias. Três principais genótipos/fenótipos (Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2) demonstram eficiências distintas em suas atividades e estão associados com a suscetibilidade e evolução de várias doenças, inclusive o diabetes mellitus (DM). Alguns estudos sugerem que o polimorfismo da Hp pode influenciar o desenvolvimento da retinopatia diabética (RD), uma importante complicação microvascular desta doença. Com o objetivo de investigar essa associação em uma população brasileira, nós determinamos os genótipos da Hp em 317 pacientes diabéticos com no mínimo 10 anos de duração da doença. Os pacientes foram classificados em diabéticos do tipo 1 (DM-1) e do tipo 2 (DM-2), com e sem RD. As frequências genotípicas dos diferentes grupos de pacientes e de um grupo controle consistindo de 142 indivíduos saudáveis, previamente estudado, foram comparadas. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os três genótipos da Hp. Níveis de hemoglobina glicosilada (HbA1c), pressão arterial sistêmica sistólica (PAS), pressão arterial sistêmica diastólica (PAD) e duração do diabetes, considerados potenciais fatores de risco para o DM, foram também comparados. Novamente, nenhuma diferença significativa foi observada entre os genótipos. Assim nós concluímos que o polimorfismo da Hp não está associado com a presença da RD na população brasileira aqui estudada.



ABSTRACT

Haptoglobin (Hp) is an acute phase protein with antioxidant and immunomodulatory properties. Three main genotypes/phenotypes (Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2) show distinct efficiencies in these activities and have been associated with susceptibility and outcome in several diseases, including diabetes mellitus (DM). It has been suggested that Hp polymorphism may influence the development of retinopathy, an important microvascular complication in DM. In order to investigate this association in a Brazilian population, we determined the Hp genotypes of 317 diabetic patients with at least 10 years of disease. The patients were classified as DM-type 1 and DM-type 2, with and without diabetic retinopathy (DR). The Hp genotype frequencies of the different patient groups and of a control group consisting of 142 healthy individuals who had previously been studied were compared. No significant differences were observed for the three Hp genotypes. Hemoglobin A1c levels, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and duration of diabetes, which are potential risk factors for DR, were also compared. Again no significant differences were observed for the three Hp genotypes. Thus, we conclude that this polymorphism is not associated with the presence of DR in the Brazilian population studied here.



1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1- A Haptoglobina

A haptoglobina (Hp) é uma $\alpha 2$ -sialoglicoproteína, descrita por Polonovski e Jayle em 1938, presente no soro de todos os mamíferos. Sua síntese é realizada principalmente nos hepatócitos, embora também tenha sido descrita em cultura de linfócitos e em tecido cerebral, e é induzida em resposta à secreção de algumas citocinas, como a interleucina 6 (IL-6), a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF) (Wintrobe, 1998; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004; Van Vlierberghe et al., 2004).

A destruição dos eritrócitos no interior dos vasos sangüíneos, que corresponde a aproximadamente 10 a 20% da destruição eritrocitária normal, leva à liberação de hemoglobina (Hb) livre no plasma. A função primordial da Hp é a de se ligar a essa Hb, prevenindo assim a excreção renal de ferro e protegendo os vasos dos seus efeitos oxidativos (Langlois e Delanghe, 1996; Wintrobe, 1998; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004). Mesmo quando a destruição é de caráter predominantemente extravascular, ainda assim parte das hemácias sofre lise no compartimento intravascular, o que é evidenciado pelas concentrações reduzidas de Hp observadas nas doenças falciformes e nas talassemias, por exemplo (Hillman e Finch, 1992).

A concentração sérica de Hp é influenciada pela idade e passa a ser mensurável a partir dos três meses, aumentando gradualmente até os níveis de adultos, por volta dos vinte anos (concentrações entre 30 e 200 mg/dL). Quando não ligada à Hb, deixa o plasma em cerca de 3,5 a 5 dias e quando ligada à Hb, o tempo médio de remoção do complexo é de aproximadamente 20 minutos (Langlois e Delanghe, 1996; Wintrobe, 1998).

Como é também considerada uma proteína de fase aguda positiva, possuindo propriedades imunomodulatórias, que podem ser inibitórias ou estimulatórias da resposta imune, encontra-se aumentada nos processos inflamatórios, infecciosos e nas malignidades (Braeckman et al., 1999; Wassel, 2000; Awadallah e Atoum, 2004). Seus níveis permitem também avaliar a ocorrência de episódios hemolíticos recentes quando, por aumento de consumo, as concentrações séricas encontram-se diminuídas (Langlois e Delanghe, 1996; Dobryszczycka, 1997).

1.2- Estrutura Protéica da Haptoglobina

Há diferenças de peso molecular entre os diferentes tipos de Hp: a proteína Hp1-1 é a menor molécula (86 KDa), Hp2-1 possui um peso intermediário (86-300 KDa) e Hp2-2 apresenta o maior peso molecular (170-900 KDa) (Langlois e Delanghe, 1996).

A composição polimérica é tipo dependente, pois o produto protéico do alelo HP1 é monovalente e do alelo HP2 é bivalente; dessa forma, a Hp é encontrada como dímero em homozigotos Hp1-1, como polímero linear em heterozigotos Hp2-1, e como polímero cíclico em indivíduos homozigotos Hp2-2 (Frank et al., 2001; Levy, 2003).
(Figura 1)

As diferenças de forma e tamanho constituem as bases para o método de fenotipagem, que tem sido o mais comumente utilizado para determinar os subtipos de Hp (Santoro et al., 1982).

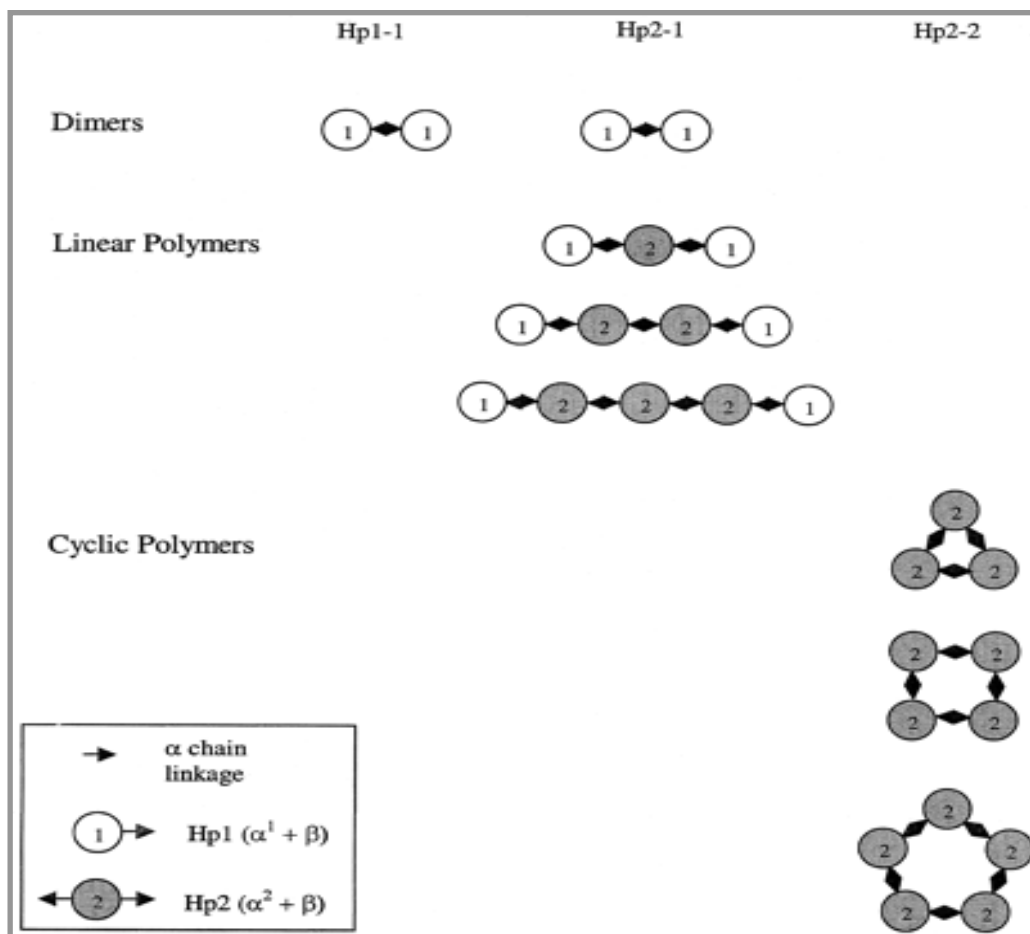


Figura 1- Representação esquemática das diferentes estruturas protéicas correspondentes aos três fenótipos da Hp (adaptada de Frank et al., 2001)

1.3- Os Genes da Haptoglobina

A molécula tetramérica da Hp lembra aquela de determinadas imunoglobulinas, por possuir duas cadeias leves (α) e duas cadeias pesadas (β), ligadas covalentemente entre si por pontes de dissulfeto (S-S) (Langlois e Delanghe, 1996; Yano et al., 1998). Embora presente em todos os vertebrados, em humanos é caracterizada por uma heterogeneidade molecular resultante de um polimorfismo genético. Jayle e Judas, em 1946, foram os primeiros a suspeitar das variações das moléculas de Hp; Smithies, em 1955, utilizando eletroforese em gel de amido, observou que ocorriam variações nas moléculas de Hp entre indivíduos diferentes e assim identificou os três fenótipos principais: Hp1-1, Hp1-2 e

Hp2-2 (Langlois e Delanghe, 1996; Devlin, 1997). Em 1956, Smithies e Walker, demonstraram que estes fenótipos são controlados por dois alelos autossômicos codominantes, que foram denominados HP1 e HP2.

McGill et al., em 1984, mapearam os genes das cadeias α e β da Hp humana no braço longo do cromossomo 16 (16q22) utilizando a técnica da hibridização *in situ*. Eles são ligados entre si, de modo que um único mRNA é sintetizado, gerando uma única cadeia polipeptídica, maior, que é então clivada para formar as duas cadeias distintas (Raugei et al., 1983; Koch et al., 2003).

A cadeia β possui 40 kDa, sua constituição é de 245 aminoácidos e não apresenta polimorfismo genético. O polimorfismo da Hp humana ocorre como resultado de alterações genéticas na menor de suas cadeias polipeptídicas, ou seja, na cadeia α , sendo fruto das diferenças entre a cadeia $\alpha 1$ (com 83 aminoácidos) e a cadeia $\alpha 2$ (com 142 aminoácidos). A cadeia $\alpha 1$ pode ainda ser classificada em $\alpha 1S$ (“*slow*”) ou $\alpha 1F$ (“*fast*”), conforme a mobilidade eletroforética; elas diferem nos aminoácidos das posições 52 e 53, sendo asparagina e ácido glutâmico em $\alpha 1S$, e ácido aspártico e lisina em $\alpha 1F$. Estas substituições de base estão presentes no éxon 4 do gene HP1 (Black e Dixon, 1968; Yano et al., 1998).

Smithies et al., em 1962, postularam que a cadeia $\alpha 2$ surgiu de um *crossing over* desigual entre dois alelos HP1; esta permuta ocorreu entre o quarto íntron de um alelo HP1F e o segundo íntron de um alelo HP1S (Raugei et al., 1983; Maeda, 1985). Assim, a região de aproximadamente 2 kb, responsável por codificar do 11º ao 69º resíduo da cadeia $\alpha 1F$, é duplicada e sua correspondente seqüência de aminoácidos inserida na cadeia $\alpha 1S$, formando assim, a cadeia $\alpha 2$, quase duas vezes mais longa que a cadeia $\alpha 1$. Desta forma, o gene HP2 apresenta 7 éxons e não os 5 que constituem o alelo HP1 (Raugei et al., 1983; Koch et al., 2003) (**Figura 2**).

As combinações entre esses alelos levam à formação de 6 genótipos distintos e seus correspondentes fenótipos: Hp1S-1S, Hp1S-1F, Hp1F-1F, Hp2-1S, Hp2-1F e Hp2-2 (Yano et al., 1998).

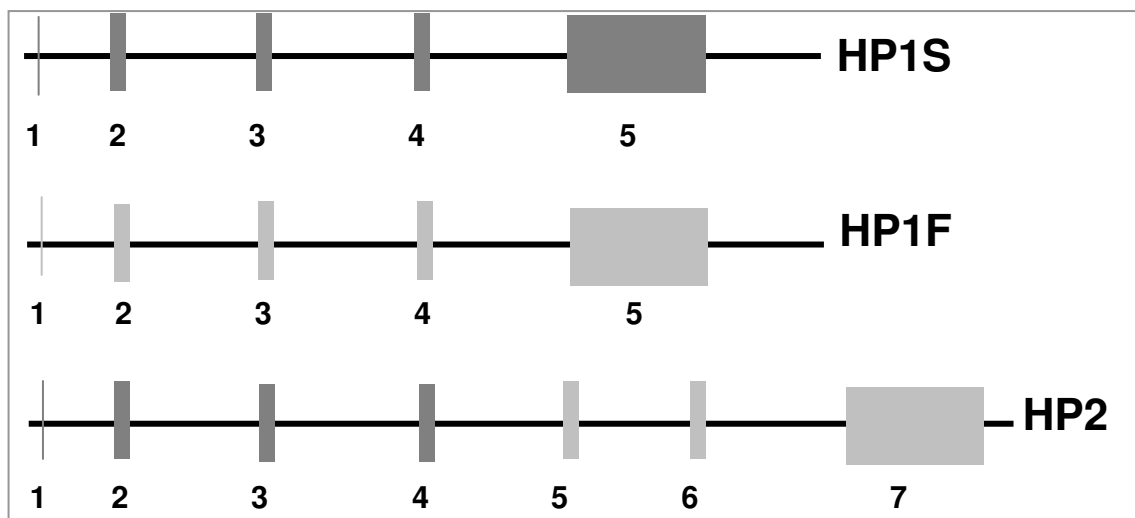


Figura 2- Representação esquemática da estrutura dos genes da Hp. Os boxes indicam os éxons (adaptada de YANO et al.,1998).

1.4- O Gene Hpr

No homem e nos macacos do velho mundo, a sequência do gene HP está duplicada (2.2 kilobases a jusante do próprio gene), no cromossomo 16 (Maeda, 1984; Murajan et al., 1988; Wintrobe, 1988). Este outro gene é chamado de gene relacionado à Hp (Hpr). Em alguns indivíduos de origem africana, múltiplas cópias estão presentes. O gene HPr difere primariamente do gene HP por ter uma sequência do tipo retrovírus inserida no primeiro íntron; sua região promotora é ativa e codifica uma proteína chamada *haptoglobin-related protein* (Hpr) que, aparentemente, possui estrutura normal, mas cuja função permanece indeterminada (Maeda, 1984).

Muranjan et al., em 1998, estimaram as concentrações de Hp e de Hpr no soro de indivíduos normais e em pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna. Nesta patologia observa-se extensiva hemólise intravascular, resultando em excesso de Hb livre na circulação e subsequente depleção de Hp; como esperado, foram observados níveis muito baixos de Hp, comparados aos níveis de indivíduos saudáveis, enquanto os níveis de Hpr não diferiram significativamente, demonstrando assim não existir ligação da Hpr com a Hb. Estes achados não são, no entanto, consensuais. Recentemente, Nielsen et al. (2006)

realizando análises com *surface plasmon resonance*, observaram as afinidades de ligação das proteínas recombinantes Hpr e Hp com a Hb. Este estudo demonstrou que Hpr competiu de maneira semelhante à Hp pela ligação com a Hb.

Foram observados também, níveis elevados de Hpr no soro de alguns pacientes com câncer que demonstram progressão da massa tumoral, mas este mecanismo não é ainda compreendido (Maeda, 1985; Muranjan et al., 1988).

1.5- O Alelo HP0 e Variantes Estruturais

O grupo fenotípico Hp0 é originário, na maioria dos casos, de uma deleção do gene da Hp (Hp^{Del}), e é caracterizado pela ausência ou redução desta proteína no plasma, provando então, que a Hp não é essencial à sobrevivência humana (Koda et al., 1998). Ele pode ser secundário ao aumento de consumo ou diminuição de produção, como na hemólise intravascular e nas doenças hepáticas, respectivamente, ou ser geneticamente determinado (Delanghe et al., 1998; Koda et al., 2000).

A hipohaptoglobulinemia determinada geneticamente foi descrita, após análise pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e *Southern Blotting*, como o resultado de uma deleção de aproximadamente 28 Kb (**Figura 3**) envolvendo o gene todo e parte do gene Hpr. A deleção em homozigose (genótipo $\text{Hp}^{\text{Del}}/\text{Hp}^{\text{Del}}$) corresponde à ausência total da Hp sérica, enquanto que a hipohaptoglobulinemia (genótipo $\text{Hp}2/\text{Hp}^{\text{Del}}$) está associada a níveis extremamente baixos de Hp e difere do outro genótipo ($\text{Hp}1/\text{Hp}^{\text{Del}}$), que corresponde a níveis de aproximadamente 50% do observado em indivíduos com genótipos normais (Koda et al., 2000). A deleção Hp^{Del} é predominante em populações asiáticas, onde o fenótipo Hp0 atinge frequências de até 40%. Em populações africanas e européias esta deleção não tem sido detectada (Teye et al., 2004). A prevalência do fenótipo Hp0 em caucásios é estimada em cerca de 0.1% (Langlois e Delanghe, 1996).

Teye et al., em 2003, analisaram as bases genéticas do fenótipo HP0 em uma população africana de Ghana. Foram estudados 123 indivíduos e o fenótipo HP0 foi encontrado em 17 deles. Destes, 8 foram classificados como hipohaptoglobulinêmicos e 9

como ahaptoglobinêmicos. Através do sequenciamento do gene HP foram detectadas 3 substituições de base já conhecidas (A-55G, A-61C e T-104A) e 3 novas substituições, todas na região 5' do gene (C-101G, T-191G e C-242T). As mutações A-61C e C-101G foram, ambas, relacionadas à menor transcrição da proteína, mas a primeira esteve associada à ahaptoglobinemia, enquanto a segunda à hipohaptoglobinemia; as substituições T-191G e C-242T foram observadas em indivíduos com concentrações plasmáticas normais de Hp e, por outro lado, nem todos os indivíduos com o fenótipo HP0 apresentavam mutações, sugerindo um padrão multifatorial de expressão.

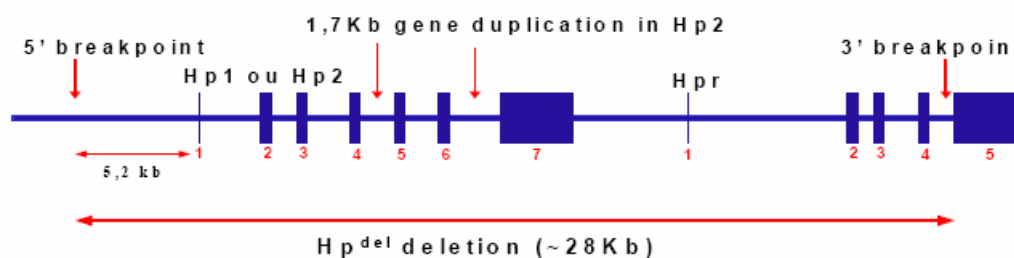


Figura 3- Representação esquemática da deleção Hp^{Del} . Os boxes indicam os éxons de Hp e Hpr. (adaptada de Koda et al., 2000).

Existem variantes estruturais da Hp descritas na literatura. A Hp Carlberg foi identificada em 1958 e está associada a uma diminuição da síntese das cadeias $\alpha 1S$. Esta proteína migra na eletroforese em gel de amido com um padrão similar à Hp2, mas são visualizadas duas ou mais bandas adicionais (Bowman e Kurosky, 1982). A Hp2-1 modificada (Hp2-1M) possui um padrão eletroforético diferente do fenótipo Hp2-1 por ter um número maior de bandas Hp1, que aparecem mais pesadas e coradas. O surgimento deste fenótipo é resultado do polimorfismo de um único nucleotídeo na região promotora do gene HP2 e ocorre com maior frequência em populações africanas (Maeda, 1991; Quaye et al., 2006). Giblett, em 1959, encontrou uma prevalência de 9,8% deste fenótipo em negros norte americanos da região de Seattle. Azevedo et al., em 1969, estudaram uma população de 541 indivíduos negros, provenientes do nordeste do Brasil, e encontraram

associação entre o alelo HP^{a2M} e a presença de hipohaptoglobulinemia (Azevedo et al., 1969). A rara Hp Johnson é resultante de um *crossing over* entre dois alelos Hp2 e resulta em hipohaptoglobulinemia ou ahaptoglobulinemia. O padrão eletroforético deste fenótipo é formado pela banda Hp1 e vários polímeros que migram lentamente (Bowman e Kurosky, 1982; Langlois e Delanghe, 1996).

1.6- Distribuição Geográfica

A frequência dos genes da Hp mostra uma notável diferença geográfica. O alelo HP1 tem sido observado menos frequentemente no sudeste da Ásia e sua mais alta frequência é observada na África e na América do Sul. Estima-se que o alelo HP2 teve origem na Índia, há aproximadamente 2 milhões de anos atrás, e se propagou em torno do mundo sob uma forte pressão genética, substituindo gradualmente a hegemonia do alelo HP1. Este fato sugere que o alelo HP2 possui uma vantagem seletiva em relação ao alelo HP1. Um aumento na frequência deste último é observado da Ásia para a América, passando através do Alaska, enquanto seu valor mais alto é encontrado na população indígena do Chile.

O equilíbrio do polimorfismo HP1/HP2 permanece geralmente em níveis constantes na população mundial. A frequência alélica na população da Europa é de aproximadamente 0.43 para o alelo HP1 e 0.57 para o alelo HP2 e nos Estados Unidos da América é de aproximadamente 0.54 para o alelo HP1 e 0.46 para o alelo HP2 (Langlois e Delanghe, 1996).

1.7- Propriedades Funcionais da Haptoglobina

Os diferentes genótipos/fenótipos da Hp apresentam diferentes características bioquímicas e biofísicas e eficiências funcionais. Sendo assim, parecem apresentar distintas capacidades antioxidativas e de imunomodulação (Wassel, 2000; Frank et al., 2001).

1.7.1- Capacidade Antioxidativa

Quando a Hb é liberada dos eritrócitos, torna-se altamente tóxica, por mediar o estresse oxidativo e a inflamação, devido à natureza oxidante do íon ferro contido em seu grupo heme (Tseng et al., 2004).

O principal papel fisiológico da Hp, como já mencionado, é remover a Hb que se encontra livre no plasma, devido à ocorrência de hemólise intravascular. A Hp e a Hb ligam-se em um complexo solúvel não covalente, essencialmente irreversível, caracterizado por uma alta estabilidade e afinidade ($>10^{10} \text{ mol}^{-1}$). Alguns estudos sugerem que a cadeia β da Hb humana contém dois sítios específicos de ligação para a Hp (resíduos $\beta 11-25$ e $\beta 131-146$), enquanto que a cadeia α tem somente um sítio de ligação para Hp (resíduos $\alpha 121-127$) (Langlois e Delanghe, 1996). Os dímeros $\alpha\beta$ da Hb se ligam estequiometricamente às subunidades $\alpha\beta$ da Hp.

A Hp circulante é saturada quando 500-1500mg de Hb livre estão presentes e a meia vida do complexo no plasma é de, aproximadamente, 20 minutos (Langlois e Delanghe, 1996; Van Vlierberghe et al., 2004).

Após a destruição dos eritrócitos, a Hb livre presente na circulação passa através da filtração glomerular e danos renais podem ocorrer. A Hp reduz a perda de Hb e ferro, porque o complexo Hp-Hb não é filtrado através dos glomérulos (Langlois e Delanghe, 1996; Devlin, 1997; Van Vlierberghe et al., 2004). Uma vez formado, ele é rapidamente removido da circulação e transportado para dois outros locais: 90% para os hepatócitos e 10% para os monócitos/macrófagos teciduais. O receptor específico para o complexo Hp-Hb nos hepatócitos ainda não foi clonado e caracterizado, mas sabe-se que apresenta uma alta afinidade de ligação. Aparentemente, este receptor reconhece a mudança conformacional da Hp, promovida pela formação do complexo com a Hb. Recentemente, o receptor deste complexo nos macrófagos foi identificado e denominado proteína CD163 (Kristiansen et al., 2001; Horn et al., 2003). Após a endocitose, o complexo é degradado pelos lisossomos. A Hp não é reciclada; o heme, no entanto, sofrendo a ação da enzima heme-oxigenase (HO), é degradado liberando o ferro, que é levado para locais onde possa ser reutilizado na síntese de outras proteínas (Hb, por exemplo), além da biliverdina, que é,

subseqüentemente, convertida em bilirrubina (Wagener et al., 2003; Van Vlierberghe et al., 2004) (**Figura 4**). A IL-6 exerce aqui um papel regulatório muito importante: assim como estimula a produção de Hp, ela também aumenta a expressão do receptor CD163 na superfície dos macrófagos e eleva a eficiência da degradação do grupo heme da Hb (Dennis, 2001).

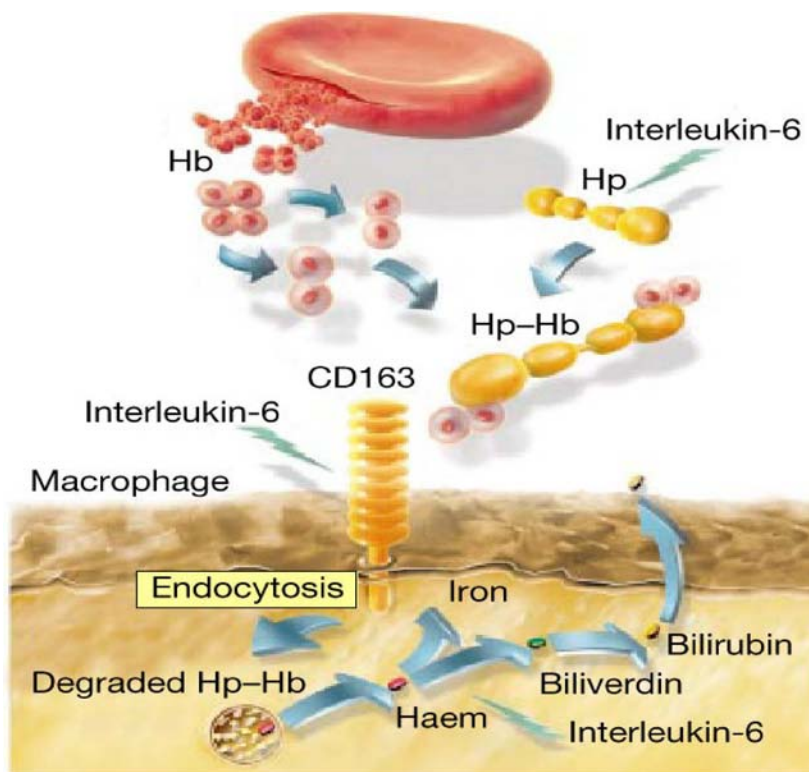


Figura 4- Representação esquemática da endocitose do complexo Hp-Hb pelo macrófago (adaptada de Dennis, 2001).

Através de todo este mecanismo, acredita-se então, que a mais importante função da Hp é servir como um antioxidante pela capacidade de prevenir os efeitos oxidativos que danificam os tecidos, mediados pela Hb livre. Esta atividade resulta, pelo menos em parte, dessa ligação com o ferro, impedindo a dissociação do heme férrico da Hb. Conforme a reação de Fenton, o ferro livre pode reagir com o oxigênio, gerando o radical tóxico superóxido, e pode reagir com H_2O_2 , gerando outro radical tóxico chamado radical hidroxila (Kaplan, 2002). O ferro pode também catalisar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, que, assim, podem danificar as células do endotélio vascular.

A capacidade da Hp em reduzir os danos causados pelos radicais livres é fenótipo-dependente (Van Vlierberghe et al., 2004). Alguns experimentos demonstraram que há uma diferença funcional entre a capacidade antioxidante da Hp purificada produzida pelos diferentes alelos. A proteína Hp1-1 mostrou conferir, “in vitro”, uma proteção maior contra danos oxidativos que a proteína Hp2-2 (Koda et al., 1998).

Estudos demonstraram que a afinidade de ligação com a Hb é igual para os três principais fenótipos da Hp (Bowman e Kurosky, 1982; Frank et al., 2001). Assim, a diferença entre Hp1-1 e Hp2-2 em inibir a oxidação pode ser resultado das diferenças na habilidade dos diferentes tipos de Hp em prevenir a liberação do heme, devido às diferenças de tamanho entre os tipos de Hp. A proteína Hp2-2 apresenta uma remoção mais lenta do ferro para o espaço extravascular por ser uma molécula mais complexa. Assim, a Hb livre permaneceria por mais tempo no vaso levando a um estresse oxidativo maior (Frank et al., 2001).

1.7.2- Capacidade Imunomodulatória

A resposta da Hp a processos inflamatórios, infecciosos e tumorais, como um reagente positivo de fase aguda, sugere uma função adicional. Estudos demonstraram que a Hp possui propriedades imunoreguladoras: indivíduos Hp2-2 demonstram ter reatividade imunológica mais intensa do que indivíduos Hp1-1 e Hp1-2 e apresentam maior produção de anticorpos após vacinação (Langlois e Delanghe, 1996). Além disso, a Hp é um importante inibidor da síntese de prostaglandina e conseqüentemente exibe um importante efeito antiinflamatório. Porém, este efeito mostrou-se menos pronunciado em indivíduos com fenótipo Hp2-2 (Langlois e Delanghe, 1996; Braeckman et al., 1999).

A Hp foi reconhecida também como um potente imunossupressor da função linfocítica, sendo capaz de inibir a resposta mitogênica dos linfócitos à fitohemaglutinina e à concanavalina A. Diferentes subtipos de linfócitos T *helper* (Th), denominados células Th1 e Th2, são responsáveis pela indução e regulação da resposta imune celular e humoral, respectivamente. As células Th1 produzem interleucina 2 (IL-2) e interferon- γ (IFN- γ),

induzem fortes respostas de IgG , favorecendo a resposta imune celular, enquanto as células *Th2* produzem interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), IL-6, interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13), intensificam a produção de IgE, mediando uma resposta, predominantemente, humoral e eosinofílica (Abbas e Lichtman, 2003). Arredouani et al. (2003) demonstraram que a Hp tem um importante papel modulador do balanço entre linfócitos *Th1* e 2 (*Th1/Th2*), promovendo uma resposta celular predominante *Th1*, que tem um maior efeito protetor nas infecções envolvendo parasitas intracelulares, inibindo assim a liberação das citocinas do tipo *Th2*, responsáveis pela defesa contra microrganismos extracelulares. Os mesmos autores, em 2005, descreveram que a Hp modula seletivamente a resposta inflamatória, pois é capaz de suprimir a síntese do fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-10 e interleucina 12 (IL-12) por monócitos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) (Arredouani et al., 2005). Guetta et al., em 2006, demonstraram que o complexo Hp1-1-Hb induz a uma produção muito maior de IL-6 e IL-10, quando comparado com Hp2-2-Hb, e que a liberação destas citocinas é dependente da ligação destes complexos com o receptor CD163 dos macrófagos e da atividade de quinase caseína II (CK II). Neste estudo, a ação desta enzima, mostrou ser modulada diferencialmente pela ligação com os diferentes complexos Hp-Hb no receptor CD163. Estes autores sugerem que, indivíduos Hp1-1 apresentam proteção vascular aumentada em relação aos indivíduos Hp2-2, por modularem diferentemente as citocinas *Th1* e *Th2* produzidas pelos macrófagos (Guetta et al., 2006).

1.8- Estudos Realizados na População Brasileira

No Brasil, vários estudos investigaram o polimorfismo da Hp em populações indígenas e da Amazônia. Simões et al., em 1989, analisaram através da eletroforese e focalização isoeletrica, o polimorfismo da Hp em duas tribos brasileiras (Macushi e índios do rio Icana). Este estudo mostrou que índios da América do Sul, quando comparados com outros grupos étnicos, apresentam alta frequência de Hp-1S e rara de Hp-1F. Quanto à sua associação com patologias humanas, há poucos estudos em nossa literatura. Beiguelman et al., em 2003, analisaram a associação de marcadores genéticos com a malária na população do oeste da Amazônia. Neste estudo, não se detectou nenhuma

associação significativa entre os fenótipos da Hp e a infecção pelo *Plasmodium*. Campregher et al., em 2004, investigaram os fenótipos da Hp em pacientes brasileiros com leucemia, com o objetivo de investigar a associação entre os 4 principais tipos de leucemia: leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica, leucemia linfóide aguda e leucemia linfóide crônica, com o gene Hp1, mas esta associação, previamente sugerida na literatura (Nevo e Tatarski, 1986; Mitchell et al., 1988), não foi confirmada no presente estudo. Apenas uma prevalência maior de “ahaptoglobinêmicos” foi verificada entre os pacientes. Um dos trabalhos mais recentes foi desenvolvido por Zaccariotto et al., em 2006, cujo objetivo foi comparar a distribuição dos principais genótipos da Hp entre pacientes HIV-soropositivos e indivíduos saudáveis HIV-soronegativos, provenientes da região sudeste, e correlacionar estes genótipos com o “status” de ferro, com as concentrações séricas das proteínas de fase aguda, com a contagem de linfócitos T-CD4+ e com a quantidade de carga viral dos pacientes. Os dados obtidos neste estudo não revelaram uma influência significativa dos genótipos da Hp na suscetibilidade à infecção pelo HIV ou na evolução clínica dos pacientes acometidos na população investigada.

1.9- O Polimorfismo da Haptoglobina e Complicações Vasculares em Pacientes com Diabetes Mellitus

As diferenças funcionais resultantes do polimorfismo genético da Hp têm levado vários pesquisadores a investigar a importância desta proteína na evolução de diversas patologias humanas, dentre elas o diabetes mellitus (DM) (Asleh et al., 2003; Levy, 2003; Awadallah e Atoum, 2004).

O DM é uma desordem metabólica geneticamente determinada, associada à deficiência absoluta ou relativa de insulina e que, em sua expressão clínica complexa, é caracterizada por alterações metabólicas e complicações vasculares e neuropáticas. O componente metabólico é caracterizado não só pela hiperglicemia, como também por alterações no metabolismo das proteínas e lipídeos. O componente vascular é constituído por macroangiopatia inespecífica, aterosclerose e suas diferentes manifestações e pela microangiopatia diabética, a qual afeta particularmente a retina e os rins (Prado et al., 1999; Tierney et al., 2001).

O mais recente relatório da Associação Americana de Diabetes (ADA) recomenda que o DM seja classificado em quatro categorias (American Diabetes Association, 2004):

- DM tipo 1: este tipo de diabetes é definido como insulinopênico (deficiência absoluta de insulina), devido à destruição crônica autoimune das células β , ou por processos idiopáticos;
- DM tipo 2: ocorre devido à resistência à insulina e insulinopenia relativa;
- Outros tipos específicos de DM: quando a etiologia de um DM 1 ou 2, inicialmente considerados idiopáticos, é descoberta, ocorre uma reclassificação como sendo de outro tipo específico. Fazem parte deste grupo os defeitos genéticos da função das células β , defeitos genéticos da ação da insulina, doenças exócrinas do pâncreas, endocrinopatias, induzidos por drogas ou agentes químicos, infecções, formas incomuns de diabetes imuno-mediadas e outras síndromes genéticas associadas ao diabetes;
- DM gestacional: abrange qualquer grau de intolerância à glicose com instalação ou primeiro diagnóstico durante a gestação.

Os pacientes com DM-1 apresentam pouca ou nenhuma capacidade de secreção de insulina e, portanto, dependem da administração de insulina exógena para evitar a ocorrência de descompensação metabólica e morte. O diabetes surge de forma abrupta no decorrer de poucos dias ou semanas, geralmente em crianças ou adultos jovens não-obesos e anteriormente saudáveis. Na época das manifestações iniciais, o paciente apresenta sintomas pronunciados de poliúria, polidipsia e perda de peso e quase sempre demonstra cetoacidose (American Diabetes Association, 2004).

Os pacientes com DM-2 conservam alguma capacidade de secreção endógena de insulina; entretanto, os níveis do hormônio estão baixos em relação ao grau de resistência à insulina e aos níveis de glicose. Estes pacientes não dependem da insulina para a sua sobrevivência imediata e raramente desenvolvem cetoacidose. Entretanto, podem necessitar de insulino-terapia para controlar a hiperglicemia. Tipicamente, este tipo de

diabetes surge depois dos 40 anos de idade, possui alta taxa de penetrância genética não relacionada a genes HLA e está associado com obesidade. A apresentação clínica é muito mais insidiosa. Os sintomas clássicos podem ser discretos e bem tolerados por longo tempo, antes que o paciente procure assistência médica. Além disso, se a hiperglicemia for assintomática, a doença pode tornar-se evidente somente após o aparecimento de complicações secundárias (Benett e Plumm, 1997; Oliveira e Milech, 2004).

Estima-se que no Brasil existam aproximadamente 5 milhões de indivíduos portadores de diabetes, dos quais metade desconhece o diagnóstico. Deste total, 90% são do tipo 2, 9% do tipo 1 e 1% a 2% associados a outras síndromes (Prado et al., 1999; Tierney et al., 2001).

O aumento do stress oxidativo que ocorre nos pacientes diabéticos resulta na oxidação da glicose e modificação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que podem estimular a produção de várias citocinas inflamatórias que estão implicadas nas mudanças morfológicas e patológicas encontradas nas complicações macro e microvasculares (Giugliano e Ceriello, 1996; Levy, 2003).

Estudos recentes que avaliaram as propriedades antioxidantes da Hp, em pacientes diabéticos, observaram diferentes graus de suscetibilidade ao desenvolvimento de problemas vasculares, estando os indivíduos Hp 1-1 aparentemente mais protegidos deste tipo de afecção do que indivíduos Hp 2-1 e Hp 2-2. Os mesmos concluíram que as diferenças na capacidade antioxidativa não se devem a diferenças de afinidade entre os subtipos de Hp e a molécula de Hb, mas que, provavelmente, pelo seu menor tamanho e estrutura, a Hp 1 tem uma maior facilidade em passar pela barreira endotelial e penetrar nos espaços extravasculares. Conseqüentemente, indivíduos Hp 1-1 parecem estar mais protegidos do estresse oxidativo que indivíduos Hp 2-1 e Hp 2-2 (Levy e Skorecki, 2000; Nakhoul et al., 2001; Asleh et al., 2003; Levy et al., 2004; Mustafa et al., 2004).

Asleh et al. (2003) demonstraram que a função antioxidante da Hp é prejudicada na presença da fração glicosilada da Hb (HbA_{1c}), que na maioria dos casos, está marcadamente aumentada nos pacientes diabéticos e até mesmo não consegue bloquear completamente a atividade oxidativa desta Hb. Desta forma, o complexo HbA_{1c}-Hp,

poderia continuar o processo oxidativo, modificando algumas proteínas, como a LDL, causando injúrias nos vasos sanguíneos. Este estudo demonstra, também, que os pacientes diabéticos apresentam uma acentuada diminuição na percentagem de monócitos que expressam o receptor CD163.

Levy et al. (2002) determinaram os fenótipos da Hp, através da eletroforese em gel de poliacrilamida, em 206 pacientes DM-2 portadores de complicações macrovasculares e em 206 indivíduos normais. A conclusão deste estudo foi que, pacientes diabéticos com fenótipo Hp2-2, apresentam uma probabilidade cinco vezes maior de apresentar complicações cardiovasculares quando comparados àqueles que possuem o fenótipo Hp1-1. Um risco intermediário foi associado ao fenótipo Hp2-1.

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação vascular altamente específica de ambos os tipos de diabetes, sendo considerada a mais freqüente causa de novos casos de perda de visão em adultos entre 20 a 74 anos (Fong et al., 2003).

Nos pacientes com DM 1, a presença da RD é pouco expressiva até o quinto ano de duração da doença; nas duas décadas seguintes, no entanto, quase todos os pacientes a desenvolvem (cerca de 90%). Cerca de 21% dos pacientes com DM 2 apresentam essa alteração vascular já ao diagnóstico inicial da doença, alcançando ela a prevalência de cerca de 65% nos casos com mais de 10 anos de diabetes (Ramos et al., 1999).

Harris et al. (1992) estudaram a prevalência da RD e a duração do-DM 2 em uma população da Austrália e Estados Unidos. Neste estudo, estimou-se que o aparecimento da RD pode preceder em 4 a 7 anos o-diagnóstico clínico deste tipo de diabetes.

Entre os fatores de risco não genéticos estão aqueles relacionados à duração da doença, ao controle glicêmico, à concomitância com a nefropatia diabética e hipertensão arterial, fatores ambientais e fatores oculares; como o controle desses fatores não é capaz de prevenir o aparecimento ou a progressão da doença na totalidade dos casos, sugere-se a existência de fatores genéticos, ainda desconhecidos (Boelter et al., 2003).

A progressão da RD é, em geral, feita ordenadamente, onde há primeiro uma fase leve, não proliferativa, caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, evoluindo para uma fase proliferativa, caracterizada por um aparecimento de novos vasos sangüíneos na retina e superfície posterior do vítreo. Gravidez, puberdade e catarata podem acelerar estas mudanças de uma fase para outra (Chandra et al., 1991; American Diabetes Association, 2002).

Nakhoul et al., em 2000, avaliaram a presença de RD em 52 pacientes com DM 1, 25 deles (48%) com evidência de retinopatia. A prevalência dessa alteração foi significativamente menor nos portadores do genótipo Hp1-1 (1 em 12 pacientes), do que nos portadores dos genótipos Hp1-2 e Hp2-2 (24 em 40 pacientes).

Estes achados não são, no entanto, consensuais. Koda et al, em 2002, analisaram os genótipos de 99 pacientes diabéticos tipo 2 com RD e 34 diabéticos sem RD, e observaram que a freqüência do genótipo Hp2-2 foi maior em pacientes sem RD, sugerindo, contrariamente a outros estudos prévios, que o alelo HP1 não produz proteção efetiva no desenvolvimento desta doença.

O DM é uma doença extremamente prevalente na atualidade e resulta em altas taxas de mortalidade, sendo considerada uma das maiores causas de morte prematura. Segundo a Federação Internacional de Diabetes, a cada 10 segundos, morre uma pessoa no mundo vítima de suas complicações (International Diabetes Federation, 2001). A população brasileira apresenta uma das mais elevadas prevalências mundiais de diabetes, e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), ela está entre as dez populações que apresentam o maior número de casos (Wild et al., 2004). Há relativamente poucos estudos disponíveis na literatura, e nenhum no Brasil, correlacionando os genótipos/fenótipos de Hp com complicações vasculares em pacientes diabéticos. Assim, a principal proposta do presente trabalho foi avaliar se os diferentes genótipos da Hp se correlacionam ou não com a presença de RD em uma amostra de pacientes diabéticos brasileiros.



2- OBJETIVOS

Para avaliar se o polimorfismo da Hp estaria se correlacionado com a presença de RD em uma população de pacientes diabéticos brasileiros, foram objetivos do presente trabalho:

- 1) Determinar as frequências alélicas e genótípicas de Hp em uma amostra de pacientes diabéticos atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP e na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, com mais de 10 anos de duração da doença, subdivididos em DM-1 e DM-2, com e sem RD;
- 2) Comparar as frequências obtidas entre os subgrupos de pacientes e com um grupo controle normal previamente estudado;
- 3) Complementarmente, avaliar a influência dos genótipos de Hp nos fatores de risco que predis põem o paciente diabético a complicações vasculares, como a HAS e níveis elevados de glicemia (avaliados através da HbA1c).



3- CAPÍTULO 1

“Haptoglobin polymorphism and diabetic
retinopathy in brazilian patients”

(aceito para publicação no “*Diabetes Research and Clinical Practice*”)

Vânia P. A. Wobeto^a, Endrigo T. Rosim^a, Mônica B. Melo^b, Luís Eduardo P Calliari^c, Maria de Fátima Sonati^a

^a Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, State University of Campinas-UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

^b Laboratory of Molecular Medicine, School of Medical Sciences, Santa Casa de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^c Pediatric Endocrinology Unit, Department of Pediatrics, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Corresponding Author:

Maria de Fátima Sonati

Department of Clinical Pathology

School of Medical Sciences

State University of Campinas – UNICAMP

Campinas – State of São Paulo – Brazil

P.O.Box 6111 – Zip Code 13083-970

Phone (55-19) 3521-9451

Fax (55-19) 3521-9434

e-mails: sonati@fcm.unicamp.br (preferred); sonati_mf@yahoo.com.br
(alternative)

Keywords: haptoglobin genotypes, diabetes mellitus, diabetic retinopathy, genetic polymorphisms, Brazilian population.

Financial support was provided by FAPESP/Brazil (grants no. 05/02383-8 and 03/09458-8).

ABSTRACT

Haptoglobin (Hp) is an acute phase protein with antioxidant and immunomodulatory properties. Three main genotypes/phenotypes (Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2) show distinct efficiencies in these activities and have been associated with susceptibility and outcome in several diseases, including diabetes mellitus (DM). It has been suggested that Hp polymorphism may influence the development of retinopathy, an important microvascular complication in DM. In order to investigate this association in a Brazilian population we determined the Hp genotypes of 317 diabetic patients with at least 10 years of disease. The patients were classified as DM-type 1 and DM-type 2, with and without diabetic retinopathy (DR). The Hp genotype frequencies of the different patient groups and of a control group consisting of 142 healthy individuals who had previously been studied were compared. No significant differences were observed for the three Hp genotypes. Hemoglobin A1c levels, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and duration of diabetes, which are potential risk factors for DR, were also compared. Again no significant differences were observed for the three Hp genotypes. Thus, we conclude that this polymorphism is not associated with the presence of DR in the Brazilian population studied here.

1. INTRODUCTION

Haptoglobin is an acute phase serum protein with antioxidant and immunomodulatory properties. It is mainly produced in the liver [1] in response to interleukin-6-type cytokines [2]. Its major biological function is to bind free plasma hemoglobin to prevent iron loss, toxicity and kidney damage during hemolysis [3]. In addition, Hp acts as a potent immunosuppressor of lymphocyte function and modulates the helper T-cell type-1 and type-2 (*Th1/Th2*) balance within the immune system [4]. In humans, the Hp locus is located on the long arm of chromosome 16 (16q22) and is polymorphic, with two main alleles (HP1 and HP2) resulting in three distinct genotypes/phenotypes (Hp1-1, Hp2-1 and Hp2-2) [3]. The different proteins produced have distinct antioxidant and immunomodulatory efficiencies, and it has been suggested that the polymorphism may influence the course of several diseases [3, 4].

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic diseases characterized by persistent hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion, insulin action or both [5]. Long-term vascular complications are the main causes of morbidity and mortality in diabetic patients [6]. Recent studies have suggested that Hp polymorphism is associated with the development of diabetic microvascular complications [7, 8], such as DR, which is very common and may lead to blindness in adults [9].

The prevalence of DM in the Brazilian population is estimated to be around 8% in the population aged between 30 and 69 years [10]. To our knowledge, there are no studies investigating the influence of Hp polymorphism on this subpopulation to date. In order to verify if there is an association between Hp genotypes and the presence of DR, we studied 317 diabetic patients subclassified as DM-1 and DM-2, with and without DR.

2. MATERIAL AND METHODS

Peripheral blood samples were collected from 317 diabetic patients with at least 10 years of disease (38% males; 88% whites; ages 13 to 75 years) who were being attended at either UNICAMP University Hospital, Campinas, or Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, São Paulo, Southeastern Brazil. Patients were classified as type 1 (n=147) or type 2 (n=170). The diagnosis of diabetes was based on clinical features, laboratory data and the guidelines of the American Diabetes Association [11]. Ophthalmic evaluation was performed by indirect fundoscopy and biomicroscopy and, in case of abnormalities, documented by retinography. Pregnant patients and those aged 75 years or older were excluded from the study. Comparisons between the groups of patients were performed according to the type of diabetes and the presence or absence of DR. Patients were also compared with a control group of 142 healthy individuals (36% males; 78% whites; ages 18 to 62 years) who had previously been studied and were from the same geographical region [12]. HbA1c level, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and duration of diabetes, which are potential risk factors for DR, were also compared. The study protocol was approved by the local ethics committee.

Genomic DNA samples were obtained from leukocytes (GFX Genomic Blood Purification Kit, Amersham Biosciences, UK). Haptoglobin genotyping was performed by polymerase chain reaction as previously described by Yano et al. [13].

Statistical analyses were performed with Statistical Analysis System 8.02 for Windows, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. The Chi-square (χ^2) test and Fischer exact test were used to evaluate association between categorical variables. The χ^2 test was also employed to evaluate if the genotype frequencies were in agreement with those expected according to the Hardy–Weinberg equilibrium. Mann-Whitney, ANOVA and Tukey tests were used to compare continuous variables for patients with those for controls. Age and gender differences were normalized by rank transformation and compared using the Kruskal-Wallis test. Association between DR and some potential risk factors was tested by multiple logistic regression. P-values < 0.05 were considered statistically significant.

3. RESULTS

Table 1 summarizes Hp genotype (and allelic) frequencies in patients and controls. They did not significantly differ of those predicted by the Hardy–Weinberg equilibrium. Table 2 shows HbA1c level, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and duration of diabetes for each group of patients according to the different genotypes.

Table 1- Haptoglobin genotype and allelic distribution in a group of Brazilian diabetic patients with or without DR and in healthy controls.

	Hp1-1 (%)	Hp2-1 (%)	Hp2-2 (%)	p	HP1	HP2	p*
DM1 with DR n=59	14 (23.73)	23 (39.98)	22 (37.29)		0.4322	0.5678	0.1140
DM1 without DR n=88	17 (19.32)	39 (44.32)	32 (36.36)		0.4148	0.5852	0.4138
				0.8031			
DM2 with DR n=97	24 (24.74)	47 (48.45)	26 (26.80)		0.4897	0.5103	0.7638
DM2 without DR n=73	17 (23.29)	36 (49.32)	20 (27.40)		0.4795	0.5205	0.9181
Controls n=142	36 (25.35)	60 (42.25)	46 (32.39)		0.4648	0.5352	0.0700
Patients n=317	72 (22.71)	145 (45.74)	100 (31.55)	0.7484	0.4558	0.5442	0.1650

(*) comparison between observed and expected allelic frequencies according to Hardy-Weinberg equilibrium

Table 2- HbA1c level, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and duration of diabetes (mean $\pm$ SD) in patients for each of the three Hp genotypes.

PARAMETERS	DM1 with DR	DM1 without DR	DM2 with DR	DM2 without DR
HbA1c (%)	Hp1-1=10.6 $\pm$ 2.7	Hp1-1=9.2 $\pm$ 1.7	Hp1-1=8.7 $\pm$ 1.9	Hp1-1=8.4 $\pm$ 1.9
	Hp2-1=8.9 $\pm$ 2.8	Hp2-1=9.7 $\pm$ 2.2	Hp2-1=8.8 $\pm$ 2.0	Hp2-1=7.8 $\pm$ 1.9
	Hp2-2=8.8 $\pm$ 1.4	Hp2-2=9.1 $\pm$ 1.6	Hp2-2=9.3 $\pm$ 1.9	Hp2-2=8.3 $\pm$ 2.2
SBP (mmHg)	Hp1-1=125.6 $\pm$ 12.4	Hp1-1=133.6 $\pm$ 40.1	Hp1-1=138.8 $\pm$ 28.3	Hp1-1=129.9 $\pm$ 18.9
	Hp2-1=132.3 $\pm$ 15.1	Hp2-1=117.5 $\pm$ 19.0	Hp2-1=149.5 $\pm$ 29.0	Hp2-1=141.4 $\pm$ 20.1
	Hp2-2=134.9 $\pm$ 28.9	Hp2-2=121.4 $\pm$ 17.3	Hp2-2=144.9 $\pm$ 23.1	Hp2-2=138.0 $\pm$ 26.4
DBP (mmHg)	Hp1-1=82.0 $\pm$ 15.2	Hp1-1=83.6 $\pm$ 13.8	Hp1-1=81.3 $\pm$ 11.9	Hp1-1=79.3 $\pm$ 7.1
	Hp2-1=78.8 $\pm$ 8.7	Hp2-1=73.5 $\pm$ 11.8	Hp2-1=86.9 $\pm$ 14.0	Hp2-1=89.4 $\pm$ 18.0
	Hp2-2=89.1 $\pm$ 16.1	Hp2-2=78.0 $\pm$ 8.4	Hp2-2=85.1 $\pm$ 14.4	Hp2-2=85.2 $\pm$ 13.4
Duration of diabetes (years)	Hp1-1=14.7 $\pm$ 3.0	Hp1-1=13.5 $\pm$ 2.6	Hp1-1=18.0 $\pm$ 5.9	Hp1-1=14.6 $\pm$ 4.5
	Hp2-1=18.9 $\pm$ 7.7	Hp2-1=14.0 $\pm$ 4.2	Hp2-1=16.8 $\pm$ 6.6	Hp2-1=13.8 $\pm$ 4.2
	Hp2-2=18.6 $\pm$ 5.2	Hp2-2=14.7 $\pm$ 3.0	Hp2-2=18.8 $\pm$ 6.9	Hp2-2=14.7 $\pm$ 3.7

*ANOVA (rank transformation)

We analyzed 147 patients with DM1 (59 with DR and 88 without DR) and 170 patients with DM2 (97 with DR and 73 without DR). Of the 156 diabetic patients with DR, 102 (65.38%) had non-proliferative DR and 54 (34.62%) had proliferative DR. There were no significant differences among the Hp genotype frequencies for DM1 and DM2 patients with and without DR; this was also true when genotype frequencies were compared with those for controls (Table 1). There were no significant differences in HbA1c levels, systolic blood pressure, diastolic blood pressure or duration of diabetes between patients with different Hp genotypes. Multiple logistic regression analyses adjusted for age and gender showed that the odds ratio of high blood pressure in non-DR patients with DM1 to DR patients with DM1 was 5.277, and that the odds ratio of elevated HbA1c in non-DR patients with DM2 to DR patients with DM2 was 1.419 (Table 3).

Table 3- Predictive values (odds ratio) of risk factors for DR using multiple logistic regression analysis

Factors for DR	Non-DR to DR (DM1)			Non-DR to DR (DM2)		
	<i>P</i> values	OR	95% CI	<i>P</i> values	OR	95% CI
High blood pressure	0.0054	5.277	1.633-17.054	0.0059	21.265	2.147-187.069
Elevated HbA1c	0.1721	1.218	0.918-1.616	0.0010	1.419	1.151-1.748

4. DISCUSSION

Several studies have related Hp polymorphism to susceptibility and outcome in important diseases such as cardiovascular, hematologic and neurologic disorders, infectious diseases, malignant neoplasms and DM [4]. An increase in oxidative stress and the generation of free radicals represent an important unifying mechanism that explains the activation of many signal transduction pathways known to mediate diabetic micro and macrovascular disease [6]. It has been suggested that the Hp2-2 phenotype is genetically predisposed to higher oxidative stress, iron accumulation, tissue damage and a major susceptibility for the development of diabetic vascular complications [14, 15]. These findings are, however, controversial and appear to depend on the population analyzed and the parameters investigated.

It has been shown that the Hp1-1 phenotype is associated with a reduced risk for the development of DR in a group of Israeli DM1 patients [8]. The authors of this study suggested that the functional differences in antioxidant capacity between the phenotypes could be responsible for this association.

On the other hand, Koda et al., investigating Japanese patients with DM2 did not find a protective effect of the HP1 allele. On the contrary, the Hp2-2 phenotype frequency was higher in patients without DR [16].

We could not find any significant differences in genotype frequencies for the DM1 and DM2 patients with or without DR analyzed here. The only statistically significant results we obtained were in relation to the already known associations between DR and high blood pressure and elevated HbA1c levels in DM1 and DM2, respectively.

In conclusion, the lack of an association between DR and polymorphism of the Hp gene indicates that Hp genotypes cannot be genetic markers of predisposition to DR in this Brazilian population.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Mrs. Cleide A. M. Silva of the Statistical and Research Committee of the School of Medical Sciences-UNICAMP for statistical analyses and Dr. Carlos Steiner and Dr. Nilma Assis of the Department of Medical Genetics of the School of Medical Sciences-UNICAMP for providing us part of the DNA samples.

REFERENCES

- [1] C. Chiellini, A. Bertacca, S.E. Novelli, C.Z. Gorgun, A. Ciccarone, A. Giordano, et al., Obesity modulates the expression of haptoglobin in the white adipose tissue via TNF α , *J. Cell. Physiol.* 190 (2002) 251-258.
- [2] M.S. Arredouani, A. Kasran, J.A. Vanoirbeek, F.G. Berger, H. Baumann, J.L. Ceuppens, Haptoglobin dampens endotoxin-induced inflammatory effects both in vitro and in vivo, *Immunology* 114 (2005) 263-271.
- [3] M.R. Langlois, J.R. Delanghe, Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans, *Clin. Chem.* 42 (1996) 1589-1600.
- [4] S.M. Sadrzadeh, J. Bozorgmehr, Haptoglobin phenotypes in health and disorders, *Am. J. Clin. Pathol.* 121 (2004) Suppl: S97-104.
- [5] American Diabetes Association, Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care* 29 (2006) Suppl: S43-48.
- [6] D. Giugliano, A. Ceriello. Oxidative stress and diabetic vascular complications, *Diabetes Care* 19 (1996) 257-263.
- [7] F.M. Nakhoul, R. Zoabi, Y. Kauter, M. Zoabi, K. Skorecki, I. Hochberg, et al., Haptoglobin phenotype and diabetic nephropathy, *Diabetologia* 44 (2001) 602-604.
- [8] F.M. Nakhoul, S. Marsh, I. Hochberg, R. Leibu, B.P. Miller, A.P. Levy, Haptoglobin genotype as a risk factor for diabetic retinopathy, *J.A.M.A.* 284 (2002) 1244-1245.
- [9] D.S. Fong, L. Aiello, T.W. Gardner, G.L. King, G. Blankenship, J.D. Cavallerano, et al., Diabetic retinopathy, *Diabetes Care* 26 (2003) Suppl: S99-102.
- [10] D.A. Malerbi, L.J. Franco, Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence, *Diabetes Care* 15 (1992) 1509-1516.

- [11] American Diabetes Association, Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care* 27 (2004) 5-10.
- [12] T.R. Zaccariotto, E.T. Rosim, D. Melo, P.M. Garcia, R.R. Munhoz, F.H. Aoki, et al., Haptoglobin polymorphism in a HIV-1 seropositive Brazilian population, *J. Clin. Pathol.* 59 (2006) 550-553.
- [13] A. Yano, Y. Yamamoto, S. Miyaishi, H. Ishizu, Haptoglobin Genotyping by Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Amplification, *Acta Med. Okayama* 52 (1998) 173-181.
- [14] M.R. Langlois, M.E. Martin, J.R. Boelaert, C. Beaumont, Y.E. Taes, M.L. De Buyzere, et al., The haptoglobin 2-2 phenotype affects serum markers of iron status in healthy males, *Clin. Chem.* 46 (2000) 1619-1625.
- [15] A.P. Levy, A. Roguin, I. Hochberg, P. Herer, S. Marsh, F.M. Nakhoul, et al., Haptoglobin phenotype and vascular complications in patients with diabetes, *N. Engl. J. Med.* 33 (2000) 969-970.
- [16] Y. Koda, S. Yamagishi, S. Amano, T. Okamoto, Y. Inagaki, K. Yamada, et al., Haptoglobin genotype and diabetic microangiopathies in Japanese diabetic patients, *Diabetología* 45 (2002) 1039-1040.



4- DISCUSSÃO

Vários estudos têm relacionado o polimorfismo da Hp com a suscetibilidade e prognóstico de várias patologias, inclusive do DM. Considerando que a população brasileira tem alta prevalência de pacientes diabéticos e que não há quaisquer estudos prévios sobre a distribuição genotípica da Hp e influência desse polimorfismo na predisposição para alterações microangiopáticas, foram analisados 317 pacientes portadores de DM, tipos 1 e 2, classificados de acordo com o mais recente relatório da ADA e atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP (n=269) e na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (n=48) e 142 controles saudáveis. Todos os pacientes e/ou seus responsáveis legais assinaram termo de consentimento informado (Anexo 3).

Todos os pacientes se encontravam em acompanhamento nestes hospitais há pelo menos 6 meses e possuíam mais de 10 anos de duração do diabetes. Não houve seleção por sexo, origem étnica, idade em que o diagnóstico foi feito, níveis de Hb glicosilada (HbA_{1c}), pressão arterial e grau de retinopatia. Foram excluídos da pesquisa apenas pacientes grávidas e aqueles com idade superior a 75 anos.

Os pacientes foram subdivididos em 4 grupos principais: pacientes com DM-1 sem RD (n=88), DM-1 com RD (n=59), DM-2 sem RD (n=73) e DM-2 com RD (n=97). A RD foi subclassificada em 2 grupos: RD proliferativa (RDP) (n=54) e RD não proliferativa (RDNP) (n=102). Os critérios para a classificação da RD foram: presença de microaneurismas, de exsudatos duros e/ou manchas algodinosas e de anormalidades microvasculares intra-retinianas para a RDNP, e presença de neovascularização, hemorragia vítrea ou deslocamento da retina para a RDP. A O grupo controle (GC) foi constituído de 142 indivíduos saudáveis (alunos e funcionários da Universidade), pertencentes à mesma região geográfica.

O grupo de pacientes com DM-1 sem RD foi composto de 88 pacientes, sendo 65% mulheres e 35% homens, 88% brancos e 12% não brancos, com faixa etária entre 13 e 51 anos; o grupo de pacientes DM-1 com RD incluiu 59 pacientes, sendo 66% mulheres e 34% homens, 92% brancos e 8% não brancos, com faixa etária 17 e 59 anos.

O grupo de pacientes com DM-2 sem RD foi constituído de 73 pacientes, sendo 53% de mulheres e 47% de homens, 85% brancos e 15% não brancos, com faixa etária entre 40 e 74 anos; o grupo de pacientes com DM-2 com RD totalizou 97 pacientes, sendo 65% de mulheres e 35% de homens, 88% brancos e 12% não brancos, com faixa etária entre 47 e 75 anos.

Os grupos diferiram significativamente quanto à idade (o grupo de pacientes com DM-1 é mais jovem que o grupo de pacientes com DM-2) (Quadro 1-Anexo 1). Essa diferença pode ser explicada pela frequência de morte precoce entre os pacientes DM-1, nos quais a doença aparece nos primeiros anos de vida e ocasiona, na maioria das vezes, complicações metabólicas agudas e infecções (Oliveira e Milech, 2004).

Entre os pacientes com RD (n=156), 65.38% apresentavam RD não proliferativa e 34.62% RD proliferativa (Quadro 2-Anexo 1). Este grupo (com RD) apresentou correlação positiva com maior tempo de doença (Quadro 3-Anexo 1). Esta associação já foi demonstrada em vários estudos, onde aproximadamente após 20 anos de duração do DM, quase todos os pacientes com DM-1 e mais de 60% dos pacientes com DM-2 apresentavam RD, sendo 20% do tipo proliferativa (Boelter et al., 2003).

O grupo controle foi constituído de 64% de mulheres e 36% de homens, sendo 78% brancos e 22% não brancos, com idade entre 18 e 62 anos. Houve diferença significativa entre os grupos de pacientes (total) e o grupo controle quanto à idade também (o grupo controle é mais jovem), além da origem étnica predominante (maior número de indivíduos não brancos entre o grupo controle) (Quadro 4-Anexo-1). Estas diferenças foram ponderadas nas comparações estatísticas (teste ANOVA com transformação *rank*), de forma a não interferirem nos resultados. Para avaliação da influência da cor, também foram comparados indivíduos brancos x não brancos, comparação que não revelou diferenças.

Os parâmetros analisados através do teste de Qui-quadrado, ou do teste exato de Fisher, utilizado quando necessário, foram as distribuições genotípicas entre os grupos GC e pacientes com DM, GC e pacientes com DM-1 e DM-2 e GC com pacientes DM-1 sem RD, pacientes DM-1 com RD, pacientes DM-2 sem RD e pacientes DM-2 com RD (Quadro 5- Anexo-1). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente

significativos. As análises das frequências alélicas e genotípicas mostram que as mesmas encontram-se em acordo com o esperado segundo a lei de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Anexo-2). Esses dados encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1- Distribuição genotípica e alélica da Hp entre os subgrupos de pacientes diabéticos, com e sem RD, e em um grupo controle normal.

	Hp1-1 (%)	Hp2-1 (%)	Hp2-2 (%)	P	HP1 (frequência alélica)	HP2 (frequência alélica)	P*
DM-1 com RD n=59	14 (23,73)	23 (39,98)	22 (37,29)	0,8031	0,4322	0,5678	0,1140
DM-1 sem RD n=88	17 (19,32)	39 (44,32)	32 (36,36)		0,4148	0,5852	0,4138
DM-2 com RD n=97	24 (24,74)	47 (48,45)	26 (26,80)		0,4897	0,5103	0,7638
DM-2 sem RD n=73	17 (23,29)	36 (49,32)	20 (27,40)	0,7484	0,4795	0,5205	0,9181
Controles n=142	36 (25,35)	60 (42,25)	46 (32,39)		0,4648	0,5352	0,0700
Pacientes n=317	72 (22,71)	145 (45,74)	100 (31,55)		0,4558	0,5442	0,1650

(*) comparação entre as frequências alélicas observadas e esperadas segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Ainda, entre os pacientes, utilizando o teste de Tukey-Kramer para as comparações múltiplas, foram analisados os níveis de HbA1c, pressão arterial sistêmica sistólica (PAS), pressão arterial sistêmica diastólica (PAD) e tempo de doença. Os resultados encontram-se na Tabela-2 e no Quadro 3-Anexo-1.

Tabela 2- Nível de HbA1c, PAS, PAD e duração do diabetes (média $\pm$ DP) no subgrupo de pacientes de acordo com os diferentes genótipos de Hp.

PARÂMETROS	DM-1 com RD	DM-1 sem RD	DM-2 com RD	DM-2 sem RD
HbA1c (%)	Hp1-1=10,6 $\pm$ 2,7	Hp1-1=9,2 $\pm$ 1,7	Hp1-1=8,7 $\pm$ 1,9	Hp1-1=8,4 $\pm$ 1,9
	Hp2-1=8,9 $\pm$ 2,8	Hp2-1=9,7 $\pm$ 2,2	Hp2-1=8,8 $\pm$ 2,0	Hp2-1=7,8 $\pm$ 1,9
	Hp2-2=8,8 $\pm$ 1,4	Hp2-2=9,1 $\pm$ 1,6	Hp2-2=9,3 $\pm$ 1,9	Hp2-2=8,3 $\pm$ 2,2
PAS (mmHg)	Hp1-1=125,6 $\pm$ 12,4	Hp1-1=133,6 $\pm$ 40,1	Hp1-1=138,8 $\pm$ 28,3	Hp1-1=129,9 $\pm$ 18,9
	Hp2-1=132,3 $\pm$ 15,1	Hp2-1=117,5 $\pm$ 19,0	Hp2-1=149,5 $\pm$ 29,0	Hp2-1=141,4 $\pm$ 20,1
	Hp2-2=134,9 $\pm$ 28,9	Hp2-2=121,4 $\pm$ 17,3	Hp2-2=144,9 $\pm$ 23,1	Hp2-2=138,0 $\pm$ 26,4
PAD (mmHg)	Hp1-1=82,0 $\pm$ 15,2	Hp1-1=83,6 $\pm$ 13,8	Hp1-1=81,3 $\pm$ 11,9	Hp1-1=79,3 $\pm$ 7,1
	Hp2-1=78,8 $\pm$ 8,7	Hp2-1=73,5 $\pm$ 11,8	Hp2-1=86,9 $\pm$ 14,0	Hp2-1=89,4 $\pm$ 18,0
	Hp2-2=89,1 $\pm$ 16,1	Hp2-2=78,0 $\pm$ 8,4	Hp2-2=85,1 $\pm$ 14,4	Hp2-2=85,2 $\pm$ 13,4
Duração do diabetes (anos)	Hp1-1=14,7 $\pm$ 3,0	Hp1-1=13,5 $\pm$ 2,6	Hp1-1=18,0 $\pm$ 5,9	Hp1-1=14,6 $\pm$ 4,5
	Hp2-1=18,9 $\pm$ 7,7	Hp2-1=14,0 $\pm$ 4,2	Hp2-1=16,8 $\pm$ 6,6	Hp2-1=13,8 $\pm$ 4,2
	Hp2-2=18,6 $\pm$ 5,2	Hp2-2=14,7 $\pm$ 3,0	Hp2-2=18,8 $\pm$ 6,9	Hp2-2=14,7 $\pm$ 3,7

*ANOVA (com transformação rank)

Os resultados das regressões logísticas múltiplas, ajustadas para idade e cor, mostraram que para o DM1 o fator preditivo para RD é a hipertensão: pacientes com hipertensão arterial sistêmica tem 5,3 vezes mais chances de desenvolver retinopatia do que os que não tem a hipertensão. No DM2 o fator preditivo para RD é a HbA1c: o aumento de 1% desta hemoglobina eleva o risco de ter retinopatia em 1,4 vezes (Quadros 6 e 7- Anexo-1). Esses valores estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3- Regressão Logística Múltipla, modelando a probabilidade de ter RD em cada tipo de diabetes.

Fatores para RD	DM-1 sem RD para com RD			DM-2 sem RD para com RD		
	<i>P</i> values	OR	95% IC	<i>P</i> values	OR	95% IC
HAS	0,0054	5,277	1,633-17,054	0,0059	21,265	2,147-187,069
HbA1c elevada	0,1721	1,218	0,918-1,616	0,0010	1,419	1,151-1,748

Nossos achados estão em concordância com o estudo de Boelter et al. (2003), que avaliou os fatores de risco para o desenvolvimento RD na população brasileira e concluiu que os principais são os níveis elevados de glicemia (avaliados através da HbA1c), a HAS e o longo tempo de duração da doença. Estes resultados enfatizam que um adequado controle dos níveis glicêmicos e da HAS podem prevenir a incidência da RD e a sua progressão.

Evidências apontam o estresse oxidativo como um fator importante no desenvolvimento das complicações vasculares diabéticas, as quais contribuem para a morbidade e mortalidade associada ao DM (Giugliano e Ceriello, 1996). Estudo relativamente recente sobre as propriedades antioxidantes da Hp, em pacientes diabéticos, observou diferentes graus de susceptibilidade ao desenvolvimento de problemas vasculares, estando os indivíduos Hp 1-1 aparentemente mais protegidos desse tipo de afecção do que indivíduos Hp 2-1 e Hp 2-2 (Frank et al., 2001). O mesmo concluiu que as diferenças na capacidade antioxidativa não se devem a diferenças de afinidade entre os subtipos de Hp e à molécula de Hb, mas que, provavelmente, pelo seu menor tamanho e estrutura, a Hp 1 tem uma maior facilidade em passar pela barreira endotelial e penetrar nos espaços extravasculares. Conseqüentemente, indivíduos Hp 1-1 parecem estar mais protegidos do estresse oxidativo que indivíduos Hp 2-1 e Hp 2-2 (Frank et al., 2001). Estes resultados não são, no entanto, consensuais, e parecem depender de cada grupo populacional investigado.

No presente estudo, as diferenças na distribuição dos genótipos entre os grupos de pacientes, bem como entre pacientes e o grupo controle, não atingiram nível de significância (Quadro 5-Anexo-1), o que implica dizer que, na população analisada, os genótipos da Hp não se correlacionam com a presença de RD, seja na DM tipo 1, seja na DM tipo 2. Nossos resultados estão em concordância com os obtidos por Koda et al., em 2002, que analisaram os genótipos da Hp de 99 pacientes japoneses com DM-2 com RD e 34 sem RD e também não encontraram proteção efetiva do alelo HP1 contra o desenvolvimento dessa complicação. Eles discordam, entretanto, dos resultados observados por Nakhoul et al. que, em 2001, analisaram os genótipos da Hp em 52 pacientes israelitas com DM-1, 25 deles (48%) com evidência de retinopatia. A prevalência dessa alteração foi significativamente menor nos portadores do genótipo Hp1-1 (1 em 12 pacientes), do que a encontrada nos portadores dos genótipos Hp1-2 e Hp2-2 (24 em 40 pacientes).

As diferenças de resultados entre os vários estudos realizados podem estar relacionadas aos tamanhos amostrais analisados, heterogêneos e nem sempre representativos das populações, e à composição étnica dos grupos populacionais investigados. Associações sutis com eventos clínicos requerem tamanhos amostrais expressivos para poderem ser observadas, o que muitas vezes inviabiliza o trabalho. Em relação à composição étnica, a população analisada por Koda et al., japonesa, é considerada geneticamente homogênea; a população analisada por Nakhoul et al., israelita, apresenta uma heterogeneidade restrita, com predomínio de judeus e uma minoria árabe; a população brasileira é altamente miscigenada, sendo formada por uma combinação de ancestralidade indígena, européia (principalmente portugueses, italianos, espanhóis e alemães) e africana, com uma minoria de ascendência asiática (principalmente japoneses) e árabe (libaneses e sírios).

Há ainda outros aspectos a serem considerados. Existe uma grande variabilidade da prevalência do DM na população mundial, exemplificadas pelas mais baixas taxas de 0,6 indivíduos por 100 mil habitantes na Coreia e no México, até as mais altas na Finlândia, com 35,3 por 100 mil habitantes. Na fisiopatologia desta doença há múltiplos fatores genéticos e ambientais envolvidos que interferem em seu curso. O controle e a prevenção dos fatores de risco, diferentes nas várias populações mundiais,

determinam a evolução desta patologia. Portanto, resultados discordantes podem ser obtidos também por essas razões, havendo diferenças marcantes na epidemiologia, na prevenção e no controle do DM em cada população analisada.

Nos pacientes aqui investigados, somente a pressão arterial aumentada e os níveis elevados de HbA1c foram considerados como fatores de risco independentes para a RD em pacientes com DM-1 e DM-2, respectivamente. Cumpre esclarecer que, no caso do DM-2, todos os pacientes, com uma única exceção, apresentaram HAS. Esta associação é responsável pela OR elevada, de 21,3, que, no modelo matemático adotado, faz com que DM e HAS se comportem como uma única patologia, não permitindo, portanto, que a influência da HAS sobre a RD seja avaliada isoladamente.

Assim, na amostra populacional aqui estudada não se pode observar qualquer correlação entre os genótipos de Hp e a presença de RD em pacientes diabéticos, tanto no diabetes do tipo 1 quanto no diabetes do tipo 2.



5- CONCLUSÕES

- 1) Foram determinadas as frequências alélicas e genóticas de Hp nesta subpopulação de pacientes diabéticos brasileiros;
- 2) As frequências obtidas não diferiram daquelas encontradas no GC, bem como não se observou diferença significativa quando comparados os subgrupos DM-1 e DM-2, com e sem RD;
- 3) Não se observou influência dos genótipos de Hp sobre os níveis de pressão arterial sistêmica e de HbA1c nesta amostra de pacientes. Esses dois parâmetros apresentaram correlação com a RD (o primeiro com DM-1 e o segundo com DM-2, respectivamente), independentemente dos genótipos de Hp.

Cumpre salientar que essas afirmações são válidas para a população ora estudada, não podendo ser extrapolada para outros grupos populacionais, nem mesmo para a população brasileira como um todo.



6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. Fifth edition. USA: Ed. Saunders; 2003.p.65-274.

American Diabetes Association. Diabetic retinopathy. Diabetes Care 2002; 25:90-93.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2004; 27:5-10.

Asleh R, Marsh S, Shilkrut M, Binah O, Guetta J, Lejbkiewicz F, et al. Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. Circ Res 2003; 92:1193-1200.

Arredouani M, Matthijs P, Hoeyveld V, Kasran A, Baumann H, Ceuppens JL. Haptoglobin directly affects cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. Immunol 2003; 108: 144-151.

Arredouani M, Kasran A, Vanoirbeek JA, Berger FG, Baumann H, Ceuppens JL. Haptoglobin dampens endotoxin-induced inflammatory effects both in vitro and in vivo. Immunol 2005; 114:63-271.

Awadallah SM, Atoum MF. Haptoglobin polymorphism in breast cancer patients from Jordan. Clin Chim Acta 2004; 341:17-21.

Azevedo E, Krieger H, Morton NE. Ahaptoglobinemia in Northeastern Brazil. Hum Hered 1969; 19:603-612.

Beiguelman B, Alves FP, Moura MM, Engracia V, Nunes ACS, Heckmann MIO, et al. The association of genetic markers and malaria infection in the Brazilian western amazonian region. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98:445-460.

Bennett JD, Plumm F. Cecil-Tratado de Medicina Interna. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A; 1997.p.1391-1413.

Black JA, Dixon GH. Amino-acid sequence of alpha chains of human haptoglobin. Nature 1968; 218:736-741.

Boelter MC, Azevedo MJ, Gross JL, Lavinsky J. Fatores de risco para a retinopatia diabética. Arq Bras Oftalmol 2003; 66:239-247.

Bowman BH, Kurosky A. Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossover, and point mutation. Adv Hum Genet 1982; 12:189-261.

Braeckman L, Bacquer DD, Delanghe J, Claeys L, Backer GD. Association between haptoglobin polymorphism, lipids, lipoproteins and inflammatory variables. Atherosclerosis 1999; 143:383-388.

Campregher PV, Metze IL, Grotto HZW, Sonati MF. Haptoglobin phenotypes in Brazilian patients with leukemia. J Bras Pat Med Lab 2004; 40:307-309.

Chandra T, Lakshmi CN, Padma T, Vidyavathi M. Haptoglobin phenotypes in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. Hum Hered 1991; 41:347-350.

Delanghe JR, Langlois MR, Buyzereache MD. Congenital anhaploglobinemia versus hypohaploglobinemia. Blood 1988; 91(9):3254.

Dennis C. Haemoglobin scavenger. Nature 2001; 409(6817):141-143.

Devlin TM. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. Fourth edition. USA: Ed. Wiley-Liss; 1997.p.1020-1021.

Dobryszczycka W. Biological functions of haptoglobin-new pieces to an old puzzle.

Eur J Chem Clin Biochem 1997; 35(9):647-54.

Frank MM, Lache O, Enav BI, Szafrank T, Levy NS, Ricklis RM. Structure-function analysis of antioxidant properties of haptoglobin. Blood 2001; 98:3693-3698.

Fong DS, Ainello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, et al. Diabetic retinopathy. Diabetes Care 2003; 26:99-102.

Frank MM, Lache O, Enav BI, Szafrank T, Levy RM, Levy AP. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. Blood 2001; 98:3693-3698.

Giugliano D, Ceriello A. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19:247-263.

Guetta J, Strauss M, Levy NS, Fahoum L, Levy AP. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis* 2006 (*in press*).

Harris MI, Klein R, Welborn TA, Knuiman MW. Onset of NIDDM occurs at least 4-7 year before clinical diagnosis. *Diabetes Care* 1992; 15:815-819.

Hillman RS, Finch CA. *Red Cell Manual*. Sixth edition: USA: Ed. F.A Davis Company; 1992.p.1-147.

Horn IR, Nielsen MJ, Madsen M, Jacobsen C, Graversen JH, Moestrup SK, et al. Generation of a haptoglobin-hemoglobin complex-specific Fab antibody blocking the binding of the complex to CD163. *Eur J Haematol* 2003; 71:289-293.

International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas* 2001. Brussels: IDF; 2001.

Kaplan J. Strategy and tactics in the evolution of iron acquisition. *Semin Hematol* 2002;39:219-266.

Koch W, Latz W, Eichinger M, Roguin A, Levy AP, Schomig A. Genotyping of the common haptoglobin Hp1/2 polymorphism based on PCR. *Clin Chem* 2002; 48(9):1377-1382.

Koch W, Latz W, Eichinger M, Roguin A, Levy AP, Schomig A. Haptoglobin gene subtyping by restriction enzyme analysis. *Clin Chem* 2003; 49(11):1937-1940.

Koda Y, Soejima M, Yoshioka N, Kimura H. The haptoglobin-gene deletion responsible for anhaptoalbuminemia. *Am J Hum Genet* 1998; 62:245-252.

Koda Y, Watanabe Y, Soejima M, Shimada E, Nishimura M, Morishita K, et al. Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in anhaptoalbuminemic patients with antihaptoglobin antibody that causes anaphylactic transfusion reactions. *Blood* 2000; 95: 1138-1143.

Koda Y, Yamagishi S, Amano S, Okamoto T, Inagaki Y, Yamada K, et al. Haptoglobin genotype and diabetic microangiopathies in Japanese diabetic patients. *Diabetologia* 2002; 45:1039-1040.

Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SKA, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001; 409:198-201.

Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 1996; 42:1589-1600.

Levy AP, Skorecki K. Haptoglobin phenotype and vascular complications in patients with diabetes. *N Engl J Med* 2000; 343:969-970.

Levy AP, Hochberg I, Jablonski K, Resnick H, Lee ET, Best L, et al. Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: The strong heart study. *JACC* 2002; 40: 1984-1990.

Levy AP. Genetics of diabetic cardiovascular disease: identification of a major susceptibility gene. *Acta Diabetol* 2003; 40:S330-S333.

Levy AP, Larson MG, Corey D, Lotan R, Vita JA, Benjamin EJ. Haptoglobin phenotype and prevalent coronary heart disease in the Framingham offspring cohort. *Atherosclerosis* 2004; 172:361-365.

Maeda N, Yang F, Barnett DR, Bowman BH, Smithies O. Duplication within the haptoglobin Hp2 gene. *Nature* 1984; 309:131-135.

Maeda N. Nucleotide sequence of the haptoglobin and haptoglobin-related gene pair. *J Biol Chem* 1985; 260:6698-6709.

Maeda N. DNA polymorphisms in the controlling region of the human haptoglobin genes: a molecular explanation for the haptoglobin 2-1 modified phenotype. *Am J Hum Genet* 1991; 49:1958.

McGill JR, Yang F, Baldwin WD, Brune JL, Barnett DR, Bowman BH. Localization of the haptoglobin alpha and beta genes to human chromosome 16q22 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1984; 38(2):155-157.

Mitchell RJ, Carzino R, Janardhana V. Association between the two serum proteins haptoglobin and transferrin and leukemia. *Hum Hered* 1988; 38:144-150.

Murajan M, Nussenzweig V, Tomlinson S. Characterization of the human serum trypanosome toxin, haptoglobin related protein. *J Biol Chem* 1998; 273:3884-3887

Mustafa S, Vukovich T, Prikoszovich T, Winzer C, Schneider B, Esterbauer H, Wagner O, Willer AK. Haptoglobin phenotype and gestational diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 2103-2107.

Nakhoul FM, Hochburg I, Leibur R, Miller B, Levy AP. Haptoglobin genotype as a risk factor for diabetic retinopathy. *JAMA* 2000; 284:1244-1245.

Nakhoul FM, Zoabi R, Kanter Y, Zoabi M, Skorecki K, Hochberg I, et al. Haptoglobin phenotype and diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2001; 44:602-604.

Nevo S, Tatarsky I. Serum haptoglobin types and leukemia. *Hum Hered* 1986; 73:240-244.

Nielsen MJ, Petersen SV, Jacobsen C, Oxvig C, Rees D, Moller HJ, et al. Haptoglobin-related protein is a high-affinity hemoglobin binding plasma protein. *Blood* 2006; 108:2846-2849.

Oliveira JEP, Milech A. Diabetes Mellitus-Clínica, Diagnóstico e Tratamento Multidisciplinar. São Paulo: Ed. Atheneu; 2004.p.143-166

Polonovski M, Jayle MF. Existence dans le plasma sanguin d'une substance activant l'action peroxydasique, l'haptoglobine. *C.R. Soc. Biol* 1938; 129:457-460.

Prado FC, Ramos J, Valle JR. Atualização Terapêutica. São Paulo: Ed. Artes Médicas;1999.p.563-574.

Quaye IK, Ababio G, Amoah AG. Haptoglobin 2-2 phenotype is a risk factor for type 2 diabetes in Ghana. J Atheroscler Thromb 2006; 13:90-94.

Ramos SR, Sabbag FP, Busato D, Miranda AB, Moreira CA. Retinopatia diabética; estudo de uma associação de diabéticos. Arq Bras Oftalmol 1999; 62:133-136.

Raugei G, Bensi G, Colantuoni V, Romano V, Santoro C, Costanzo F, et al. Sequence of human haptoglobin cDNA: evidence that the α and β subunits are coded by the same mRNA. Nuc Acids Res 1983; 11(17):5811-5819.

Sadrzadeh SM, Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. Am J Clin Pathol 2004; 121 Suppl:S97-104.

Santoro C, Boccazzi C, Carbonara AO. A simplified procedure for haptoglobin subtyping. Hum Genet 1982; 60:287-288.

Simões AL, Kompf J, Ritter H, Luckenbach C, Zischler H, Salzano FM. Electrophoretic and isoelectric focusing studies in Brazilian Indians: data on four systems. Hum Biol 1989; 61:427-438.

Teye K, Quaye IKE, Koda Y, Soejima M, Tsuneoka M, Pang H, et al. A-61C and C-101G Hp gene promoter polymorphism are, respectively, associated with ahaptoglobinaemia and hypohaptoglobinaemia in Ghana. Clin Genet 2003; 64:439-443.

Teye K, Quaye IKE, Koda Y, Soejima M, Pang H, Tsuneoka M, et al. A novel 1247T missense mutation in the haptoglobin 2 β -chain decreases the expression of the protein and is associated with ahaptoglobinaemia. Hum Genet 2004; 114:499-502.

Tierney LM, Macphee SJ, Papadakis MA. Current Medical Diagnosis & Treatment. USA: Ed. McGraw-Hill; 2001.p.1161-1201.

Tseng CF, Lin CC, Huang HY, Liu HC, Mao SJT. Antioxidant role of human haptoglobin. *Proteomics* 2004; 4:2221-2228.

Van Vlierberghe H, Langlois M, Delanghe J. Haptoglobin polymorphism and iron homeostasis in health and in disease. *Clin Chim Acta* 2004; 345:35-42.

Wagener FADT, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GA, et al. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmac Rev* 2003; 55(3):551-571.

Wassel J. Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin Lab* 2000; 46(11-12):547-52.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047-1053.

Wintrobe MM. *Hematologia Clínica*. São Paulo: Ed. Manole Ltda;1998.p.208-238.

Yano A, Yamamoto Y, Miyaishi S, Ishizu H. Haptoglobin genotyping by allele-specific polymerase chain reaction amplification. *Acta Med Okayama* 1998; 52(4):173-181.

Zaccariotto TR, Rosim ET, Melo D, Garcia PMD, Munhoz, RR, Aoki F.H, et al. Haptoglobin polymorphism in a HIV-1-seropositive Brazilian population. *J Clin Pathol* 2006; 59:550-553.



7- ANEXOS

ANEXO 1- Dados estatísticos utilizados para elaboração do manuscrito

Câmara de Pesquisa – Estatística / FCM

Quadro 1 – Distribuição da idade, sexo e cor entre os subgrupos de pacientes e controles.

GRUPO	N	Média	desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Kruskal-Wallis)
controle	142	32.5	10.7	18.0	31.0	62.0	<0.0001
dm1comrd	57	32.1	10.5	17.0	33.0	59.0	
dm1semrd	85	24.4	8.2	13.0	22.0	51.0	
dm2comrd	97	62.9	6.9	47.0	64.0	75.0	
dm2semrd	73	60.6	8.1	40.0	61.0	74.0	

SEXO	GRUPO	p-valor=0.4838 (Qui-quadrado)				
Frequency						
Percent						
Col Pct	controle	dm1comrd	dm1semrd	dm2comrd	dm2semrd	Total
F	91 19.83 64.08	39 8.50 66.10	57 12.42 64.77	63 13.73 64.95	39 8.50 53.42	289 62.96
M	51 11.11 35.92	20 4.36 33.90	31 6.75 35.23	34 7.41 35.05	34 7.41 46.58	170 37.04
Total	142 30.94	59 12.85	88 19.17	97 21.13	73 15.90	459 100.00

COR	GRUPO					
Frequency						
Percent						
Col Pct	controle	dm1comrd	dm1semrd	dm2comrd	dm2semrd	Total
branca	111 26.75 78.17	47 11.33 92.16	64 15.42 87.67	74 17.83 88.10	55 13.25 84.62	351 84.58
parda	9 2.17 6.34	1 0.24 1.96	8 1.93 10.96	5 1.20 5.95	5 1.20 7.69	28 6.75
preta	22 5.30 15.49	3 0.72 5.88	1 0.24 1.37	5 1.20 5.95	5 1.20 7.69	36 8.67
Total	142 34.22	51 12.29	73 17.59	84 20.24	65 15.66	415 100.00

Frequency Missing = 44

Quadro 2 – Distribuição da presença ou não de outras doenças oftalmológicas e do tipo de retinopatia entre subgrupos.

OUTRAD		GRUPO				p-valor<0.0001 (Qui-quadrado)	
Frequency	Percent						
Row Pct	Col Pct	dm1comrd	dm1semrd	dm2comrd	dm2semrd	Total	
não		31	46	48	35	160	
		11.52	17.10	17.84	13.01	59.48	
		19.38	28.75	30.00	21.88		
		73.81	80.70	49.48	47.95		
sim		11	11	49	38	109	
		4.09	4.09	18.22	14.13	40.52	
		10.09	10.09	44.95	34.86		
		26.19	19.30	50.52	52.05		
Total		42	57	97	73	269	
		15.61	21.19	36.06	27.14	100.00	
Frequency Missing = 48							
TIPORD		GRUPO		p-valor=0.3712 (Qui-quadrado)			
Frequency	Percent						
Row Pct	Col Pct	dm1comrd	dm2comrd	Total			
RDNP		36	66	102			
		23.08	42.31	65.38			
		35.29	64.71				
		61.02	68.04				
RDP		23	31	54			
		14.74	19.87	34.62			
		42.59	57.41				
		38.98	31.96				
Total		59	97	156			
		37.82	62.18	100.00			

Quadro 3 – Análise descritiva e comparações das variáveis HbA1c, PAS, PAD e tempo de doença entre os grupos de pacientes e genótipos, corrigindo para idade e cor. As comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey-Kramer.

Medidas de posição e dispersão									
tipodm	rd	genotip	Variável	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo
1	não	1-1	HBA1C	11	9.2	1.7	6.6	9.7	11.7
			PASIST	7	133.6	40.1	100.0	120.0	220.0
			PADIAST	7	83.6	13.8	70.0	80.0	110.0
			TEMPOD	11	13.5	2.6	10.0	13.0	18.0
		2-1	HBA1C	28	9.7	2.2	5.9	9.4	14.1
			PASIST	25	117.5	19.0	90.0	120.0	160.0
			PADIAST	25	73.5	11.8	50.0	76.0	96.0
			TEMPOD	28	14.0	4.2	10.0	13.0	26.0
		2-2	HBA1C	18	9.1	1.6	6.9	9.0	12.5
			PASIST	13	121.4	17.3	100.0	120.0	160.0
			PADIAST	13	78.0	8.4	60.0	80.0	90.0
			TEMPOD	18	14.3	4.2	10.0	12.5	23.0
	sim	1-1	HBA1C	9	10.6	2.7	8.5	9.9	17.2
			PASIST	9	125.6	12.4	110.0	130.0	150.0
			PADIAST	9	82.0	15.2	60.0	80.0	108.0
			TEMPOD	9	14.7	3.0	10.0	15.0	20.0
		2-1	HBA1C	15	8.9	2.8	5.8	8.4	15.9
			PASIST	13	132.3	15.1	110.0	130.0	160.0
			PADIAST	13	78.8	8.7	68.0	80.0	90.0
			TEMPOD	15	18.9	7.7	10.0	16.0	35.0
		2-2	HBA1C	18	8.8	1.4	7.0	8.4	10.9
			PASIST	17	134.9	28.9	100.0	130.0	216.0
			PADIAST	17	89.1	16.1	60.0	90.0	120.0
			TEMPOD	18	18.6	5.2	10.0	18.0	30.0
2	não	1-1	HBA1C	17	8.4	1.9	5.1	8.5	11.8
			PASIST	17	129.9	18.9	100.0	130.0	170.0
			PADIAST	17	79.3	7.1	70.0	80.0	90.0
			TEMPOD	17	14.6	4.5	10.0	14.0	24.0
		2-1	HBA1C	36	7.8	1.9	4.5	7.5	12.8
			PASIST	35	141.4	20.1	108.0	140.0	190.0
			PADIAST	35	89.4	8.0	70.0	90.0	100.0
			TEMPOD	36	13.8	4.2	10.0	13.0	28.0
		2-2	HBA1C	20	8.3	2.2	5.7	8.1	12.5
			PASIST	18	138.0	26.4	120.0	130.0	226.0
			PADIAST	18	85.2	13.4	70.0	80.0	128.0
			TEMPOD	20	14.7	3.7	10.0	14.5	23.0
	sim	1-1	HBA1C	24	8.7	1.9	5.4	9.0	11.5
			PASIST	24	138.8	22.3	90.0	140.0	190.0
			PADIAST	24	81.3	11.9	60.0	80.0	110.0
			TEMPOD	24	18.0	5.9	10.0	17.5	29.0
		2-1	HBA1C	47	8.8	2.0	4.6	8.5	12.7
			PASIST	47	149.5	29.0	110.0	144.0	240.0
			PADIAST	47	86.9	14.5	60.0	80.0	150.0
			TEMPOD	47	16.8	6.6	10.0	15.0	35.0
		2-2	HBA1C	26	9.3	1.9	6.2	9.6	14.0
			PASIST	26	144.9	23.1	110.0	140.0	190.0
			PADIAST	26	85.1	14.4	60.0	80.0	120.0
			TEMPOD	26	18.8	6.9	10.0	16.5	34.0
tipodm	rd	genotip	Variável	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo

Anova nos ranks para variável HbA1c

Efeito	p-valor
IDADE	0.0189
COR	0.1872
GENOT	0.3825
rd	0.0017
rd*GENOT	0.4090
tipodm	0.5174
tipodm*GENOT	0.5191
rd*tipodm	0.2006
rd*tipodm*GENOT	0.1616

rd	HbA1c médias corrigidas
não	8.66361421
sim	9.70345249

Anova nos ranks para variável PASIST

Efeito	p-valor
IDADE	<.0001
COR	0.1112
GENOT	0.0766
rd	0.0870
rd*GENOT	0.5186
tipodm	0.6798
tipodm*GENOT	0.8213
rd*tipodm	0.9616
rd*tipodm*GENOT	0.2701

Anova nos ranks para variável PADIAST

Efeito	p-valor
IDADE	0.0220
COR	0.1523
GENOT	0.0801
rd	0.9044
rd*GENOT	0.7214
tipodm	0.9796
tipodm*GENOT	0.0101
rd*tipodm	0.0471
rd*tipodm*GENOT	0.6037

Fixando tipo de diabetes e comparando os genótipos e RD:

Efeito	p-valor Tipo 1	p-valor tipo2
IDADE	0.0015	0.8876
COR	0.2154	0.5445
GENOT	0.2299	0.0009 Diferenças (1-1 e 2-1; 2-2 e 2-1)
rd	0.4863	0.2295
rd*GENOT	0.9177	0.4886

Fixando os genótipos e comparando tipo de diabetes:

Efeito	p-valor 1-1	p-valor 2-1	p-valor 2-2
IDADE	0.0730	0.2354	0.3884
COR	0.1979	0.5498	0.4129
rd	0.5564	0.9481	0.8022
tipodm	0.3099	0.0457	0.7689
rd*tipodm	0.7613	0.0268	0.2420

Fixando RD e comparando tipo de diabetes:

Efeito	p-valor Não	p-valor Sim
IDADE	0.0258	0.2338
COR	0.2431	0.5529
GENOT	0.0630	0.5999
tipodm	0.7990	0.7053
GENOT*tipodm	0.0066	0.3637

Anova nos ranks para variável Tempo de diagnóstico					
Efeito		p-valor		tipodm	TEMPOD
IDADE		0.0002		1	médias corrigidas
COR		0.6167		2	17.7005094
GENOT		0.6560			13.1947439
rd		0.0004		rd	TEMPOD
rd*GENOT		0.9961			médias corrigidas
tipodm		0.0019		não	14.1881912
tipodm*GENOT		0.4105		sim	16.7070621
rd*tipodm		0.7147			
rd*tipodm*GENOT		0.9132			

Quadro 4 - Distribuição da idade, sexo e cor entre pacientes e controles.

GRUPO	N	Média	desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Mann-Whitney)
controle	142	32.5	10.7	18.0	31.0	62.0	
dm1+dm2	317	46.3	19.2	13.0	52.0	75.0	<0.0001

SEXO	grupo1	p-valor=0.7391 (Qui-quadrado)			COR	grupo1	p-valor= 0.0018 (Qui-quadrado)		
Frequency					Frequency				
Percent					Percent				
Col Pct	controle	dm1+dm2	Total		Col Pct	controle	dm1+dm2	Total	
F	91	198	289		branca	111	240	351	
	19.83	43.14	62.96			26.75	57.83	84.58	
	64.08	62.46				78.17	87.91		
M	51	119	170		parda	9	19	28	
	11.11	25.93	37.04			2.17	4.58	6.75	
	35.92	37.54				6.34	6.96		
Total	142	317	459		preta	22	14	36	
	30.94	69.06	100.00			5.30	3.37	8.67	
						15.49	5.13		
					Total	142	273	415	
						34.22	65.78	100.00	
						Frequency Missing = 44			

Quadro 5- Distribuição dos genótipos entre pacientes e controles.

Controle e pacientes (geral)				
GENOT	grupo1		p-valor= 0.7484 (Qui-quadrado)	
Frequency				
Percent				
Col Pct	controle	dm1+dm2	Total	
1-1	36	72	108	
	7.84	15.69	23.53	
	25.35	22.71		
2-1	60	145	205	
	13.07	31.59	44.66	
	42.25	45.74		
2-2	46	100	146	
	10.02	21.79	31.81	
	32.39	31.55		
Total	142	317	459	
	30.94	69.06	100.00	

Controle e pacientes por tipo da doença				
GENOT	tipodm		p-valor=0.4077 (Qui-quadrado)	
Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	controle	dm1	dm2	Total
1-1	36	31	41	108
	7.84	6.75	8.93	23.53
	33.33	28.70	37.96	
	25.35	21.09	24.12	
2-1	60	62	83	205
	13.07	13.51	18.08	44.66
	29.27	30.24	40.49	
	42.25	42.18	48.82	
2-2	46	54	46	146
	10.02	11.76	10.02	31.81
	31.51	36.99	31.51	
	32.39	36.73	27.06	
Total	142	147	170	459
	30.94	32.03	37.04	100.00

GENOT GRUPO p-valor=0.8031 (Qui-quadrado)						
Frequency						
Percent						
Col Pct	controle	dm1comrd	dm1semrd	dm2comrd	dm2semrd	Total
1-1	36	14	17	24	17	108
	7.84	3.05	3.70	5.23	3.70	23.53
	25.35	23.73	19.32	24.74	23.29	
2-1	60	23	39	47	36	205
	13.07	5.01	8.50	10.24	7.84	44.66
	42.25	38.98	44.32	48.45	49.32	
2-2	46	22	32	26	20	146
	10.02	4.79	6.97	5.66	4.36	31.81
	32.39	37.29	36.36	26.80	27.40	
Total	142	59	88	97	73	459
	30.94	12.85	19.17	21.13	15.90	100.00

Quadro 6– Resultado da regressão logística múltipla, ajustada para idade e cor, modelando a probabilidade de ter retinopatia diabética.

Variável		parâmetro Estimado	erro padrão	p-valor	OR	IC95%
Intercepto		-7.8311	1.7252	<.0001	–	
HbA1c		0.2840	0.0817	0.0005	1.328	1.132; 1.559
tipodm	1 x 2	1.7497	0.7034	0.0129	5.753	1.449; 22.837
GENOT	1-1 x 2-2	0.2773	0.4372	0.5258	1.320	0.560; 3.109
GENOT	2-1 x 2-2	0.1150	0.3672	0.7542	1.122	0.546; 2.304
HAS	S x n	2.2151	0.4873	<.0001	9.162	3.525; 23.813

Quadro 7– Resultados das regressões logísticas múltiplas, ajustadas para idade e cor, modelando a probabilidade de ter retinopatia diabética em cada tipo de diabetes.

1º modelo - diabetes tipo 1 (n=36 sim x n=49 não)						
Variável		parâmetro Estimado	erro padrão	p-valor	OR	IC95%
Intercepto		-9.5947	2.7130	0.0004		
HAS	S x N	1.6634	0.5985	0.0054	5.277	1.633 ; 17.054
HbA1c		0.1970	0.1442	0.1721	1.218	0.918 ; 1.616
GENOT	1-1 x 2-2	0.2176	0.7870	0.7821	1.243	0.266 ; 5.813
GENOT	2-1 x 2-2	-0.6765	0.6745	0.3159	0.508	0.136 ; 1.907
2º modelo - diabetes tipo 2						
Variável		parâmetro Estimado	erro padrão	p-valor	OR	IC95%
HAS	S x N	3.0571	1.1094	0.0059	21.265	2.417 ; 187.069
HbA1c		0.3498	0.1065	0.0010	1.419	1.151 ; 1.748
GENOT	1-1 x 2-2	0.5420	0.5463	0.3211	1.719	0.589 ; 5.017
GENOT	2-1 x 2-2	0.4761	0.4657	0.3066	1.610	0.646 ; 4.011

ANEXO-2-Avaliação das frequências genotípicas segundo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Freq absoluta	controles	Cáculo de:	Equilíbrio	Freq. esperada
D	36	p	0,4648	31
H	60		2pq	71
R	46	q	0,5352	41
Total				
N	142			
	Qui-quadrado	g 1	p-valor	
	3,226	1	7E-02	

Conclusão
Não rejeito a hipótese de equilíbrio.

Freq absoluta	dm1+dm2	Cáculo de:	Equilíbrio	Freq. esperada
D	72	p	0,4558	66
H	145		2pq	157
R	100	q	0,5442	94
Total				
N	317			
	Qui-quadrado	g1	p-valor	
	1,928	1	0,1650	

Conclusão
Não rejeito a hipótese de equilíbrio.

Freq absoluta	dm1	Cáculo de:	Equilíbrio	Freq. esperada
D	31	P	0,4218	26
H	62		2pq	72
R	54	q	0,5782	49
Total				
N	147			
	Qui-quadrado	g1	p-valor	
	2,691	1	0,1009	

Conclusão
Não rejeito a hipótese de equilíbrio.

Freq absoluta	dm2	Cáculo de:	Equilíbrio	Freq. esperada
D	41	p	0,4853	40
H	83		2pq	85
R	46	q	0,5147	45
Total				
N	170			
	Qui-quadrado	g1	p-valor	
	0,087	1	0,7674	

Conclusão
Não rejeito a hipótese de equilíbrio.

Freq absoluta	dm1semrd	Cálculo de:	Equilíbrio	Freq. esperada
D	17	p	0,4148	15
H	39		2pq	43
R	32	q	0,5852	30
Total				
N	88			
	Qui-quadrado	g1	p-valor	
	0,668	1	0,4138	
	Conclusão			
	Não rejeito a hipótese de equilíbrio.			

Freq absoluta	dm1comrd	Cálculo de:	Equilíbrio	Freq. esperada
D	14	p	0,4322	11
H	23		2pq	29
R	22	q	0,5678	19
Total				
N	59			
	Qui-quadrado	g1	p-valor	
	2,497	1	0,1140	
	Conclusão			
	Não rejeito a hipótese de equilíbrio.			

Freq absoluta	dm2semrd	Cálculo de:	Equilíbrio	Freq. esperada
D	17	p	0,4795	17
H	36		2pq	36
R	20	q	0,5205	20
Total				
N	73			
	Qui-quadrado	g1	p-valor	
	0,011	1	0,9181	
	Conclusão			
	Não rejeito a hipótese de equilíbrio.			

Freq absoluta	dm2comrd	Cálculo de:	Equilíbrio	Freq. esperada
D	24	p	0,4897	23
H	47		2pq	48
R	26	q	0,5103	25
Total				
N	97			
	Qui-quadrado	g1	p-valor	
	0,090	1	0,7638	
	Conclusão			
	Não rejeito a hipótese de equilíbrio.			

ANEXO 3- Modelo Geral do Termo de Consentimento e Pareceres do Comitê de
Ética/FCM/UNICAMP e do CONEP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do projeto: “Polimorfismo da Haptoglobina e Retinopatia Diabética”.

Responsáveis pela condução das pesquisas: Profa.Dra.Maria de Fátima
Sonati/ Vânia Peretti de Albuquerque Wobeto/ Endrigo Rosim

Nome do paciente: _____

Idade: _____ anos

RG: _____

Endereço: _____

Número HC: _____

Esse projeto de pesquisa tem como objetivo investigar se um determinado tipo de uma proteína presente no sangue, chamada haptoglobina, estaria associado a uma predisposição maior ao desenvolvimento de alterações de retina em indivíduos diabéticos. Essas alterações, se não tratadas, podem levar à perda de visão. Se os resultados mostrarem que um determinado tipo de haptoglobina se relaciona a uma maior tendência em desenvolver alterações de retina, esta informação poderá ser incluída no protocolo de atendimento dos pacientes diabéticos, que poderão ter um acompanhamento mais freqüente pelos clínicos e oftalmologistas e um maior controle dos níveis de Hb glicosilada.

A determinação dos tipos de haptoglobina não resulta em nenhum tipo de implicação familiar e/ou necessidade de aconselhamento genético.

O procedimento a que os pacientes serão submetidos será uma única punção venosa, em tubo de hemograma, por ocasião de seus retornos de seguimento aos ambulatorios do HC-UNICAMP, não sendo necessário jejum. Pede-se apenas que se evite alimentação gordurosa. As amostras serão armazenadas por um período não superior a trinta meses e não poderão ser utilizadas para outros fins. Fica claro que o paciente poderá não participar da pesquisa, sem prejuízo do atendimento, cuidado e tratamento pelas especialidades do HC.

Serão mantidos o sigilo e o caráter confidencial das informações, zelando-se pela privacidade do paciente e garantindo que sua identificação não será exposta nas conclusões ou publicações.

O telefone da Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa para os casos de recursos ou reclamações do paciente é: (019) 3788-8936, e os dos responsáveis pela pesquisa (019) 3788-7447 / 3788-9453.

Campinas, ____ de _____ de 2004.

Assinatura do paciente ou Responsável legal

Vânia Peretti A. Wobeto

Endrigo Rosim

Profa.Dra. Maria de Fátima Sonati



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☒ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 18/01/05.

(PARECER PROJETO 442/2003)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DA HAPTOGLOBINA NA RETINOPATIA DIABÉTICA”

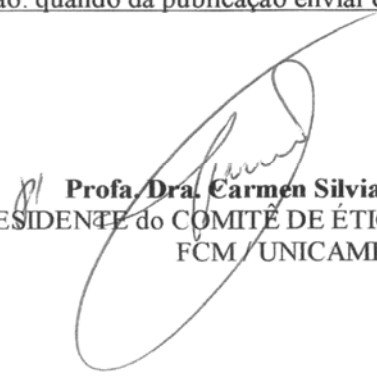
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Vânia Peretti de Albuquerque Wobeto

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP aprovou o Relatório Parcial, apresentado em dezembro de 2004, do protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Recomendação: quando da publicação enviar cópia ao CEP/FCM.


Prof.ª Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER N.º 1557/2004

Registro CONEP: 9665 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP:

Processo n.º 25000.007750/2004-71

Projeto de Pesquisa: " *Influência do polimorfismo da haptoglobina na retinopatia diabética.* "

Pesquisador Responsável: Dra. Vania Peretti de Albuquerque Wobeto

Instituição: UNICAMP

Área Temática Especial: Genética humana

Ao se proceder à análise das respostas ao Parecer CONEP nº 608/2004, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a- Foram atendidas as solicitações do referido parecer.
- b- O projeto preenche os requisitos fundamentais da Resolução CNS 196/96 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.
- c- O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado

Brasília, 29 de julho de 2004.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

THE GENETIC POLYMORPHISM OF HUMAN HAPTOGLOBIN

Vânia P. A. Wobeto^a, Tânia R. Zaccariotto^a, Maria de Fátima Sonati^a

^a Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, State University of Campinas-UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Corresponding Author:

Maria de Fátima Sonati

Department of Clinical Pathology

School of Medical Sciences

State University of Campinas – UNICAMP

Campinas – State of São Paulo – Brazil

P.O.Box 6111 – Zip Code 13083-970

Phone (55-19) 3521-9451

Fax (55-19) 3521-9434

e-mails: sonati@fcm.unicamp.br (preferred); sonati_mf@yahoo.com.br
(alternative)

Keywords: haptoglobin phenotypes, haptoglobin genotypes, genetic polymorphisms.

Financial support was provided by FAPESP/Brazil (grants no. 05/02383-8).

THE GENETIC POLYMORPHISM OF HUMAN HAPTOGLOBIN

THE HUMAN HAPTOGLOBIN

Haptoglobin (Hp) is an α_2 -sialoglycoprotein present in the serum of all mammals and was first described by Polonovski and Jayle in 1938. It is synthesized mainly in hepatocytes, although its synthesis has also been described in lymphocyte culture and brain tissue. Its synthesis is induced in response to secretion of some cytokines, such as interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) (Wintrobe, 1998; Sadrzadeh and Bozorgmehr, 2004; Van Vlierberghe et al., 2004).

Destruction of red blood cells inside blood vessels, which corresponds to approximately 10 to 20% of the normal destruction of red blood cells, leads to the release of free hemoglobin (Hb) in the plasma. The primary function of Hp is to bind to this Hb, thus preventing renal excretion of iron and protecting blood vessels from the oxidative effects of iron (Langlois and Delanghe, 1996; Wintrobe, 1998; Sadrzadeh and Bozorgmehr, 2004). Even when the destruction is mainly extravascular, some of the erythrocytes undergo lysis in the intravascular compartment, as evidenced, for example, by the reduced concentration of Hp in the serum observed in sickle cell diseases and in thalassemia (Hillman and Finch, 1992).

The serum concentration of Hp is influenced by age and is measurable from three months onwards, after which it increases gradually, reaching adult levels at the age of 20 years (concentrations of between 30 and 200 mg/dL). When it is not bound to Hb, Hp is cleared from the plasma in approximately 3.5 to 5 days, and when bound to Hb, the average time for the complex to be removed is approximately 20 minutes (Langlois and Delanghe, 1996; Wintrobe, 1998).

Because it is also considered a positive acute-phase protein, with immunomodulatory properties that may either inhibit or stimulate the immune response, Hp concentration is increased in inflammatory and infectious processes and in malignancies (Braeckman et al., 1999; Wassel, 2000; Awadallah and Atoum, 2004). Measurement of Hp serum levels can also be used to determine whether there have been recent haemolytic episodes, as increased Hp consumption during these episodes leads to reduced levels of this protein (Langlois and Delanghe, 1996; Dobryszczyka, 1997).

Protein Structure

The different types of Hp have different molecular weights: the Hp1-1 protein is the smallest molecule (86 kDa), Hp2-1 is of intermediate weight (86-300 kDa) and Hp2-2 has the highest molecular weight (170-900 kDa) (Langlois and Delanghe, 1996).

The polymeric composition is haptoglobin-type dependent, as the protein product of the HP1 allele is monovalent and that of the HP2 allele bivalent; thus, Hp is found as a dimer in Hp1-1 homozygotes, as a linear polymer in Hp2-1 heterozygotes and as a cyclic polymer in Hp2-2 homozygous individuals (Frank et al., 2001; Levy, 2003). (Figure 1).

The differences in shape and size form the basis of the phenotyping method, which is the most commonly used method to determine Hp subtypes (Santoro et al., 1982).

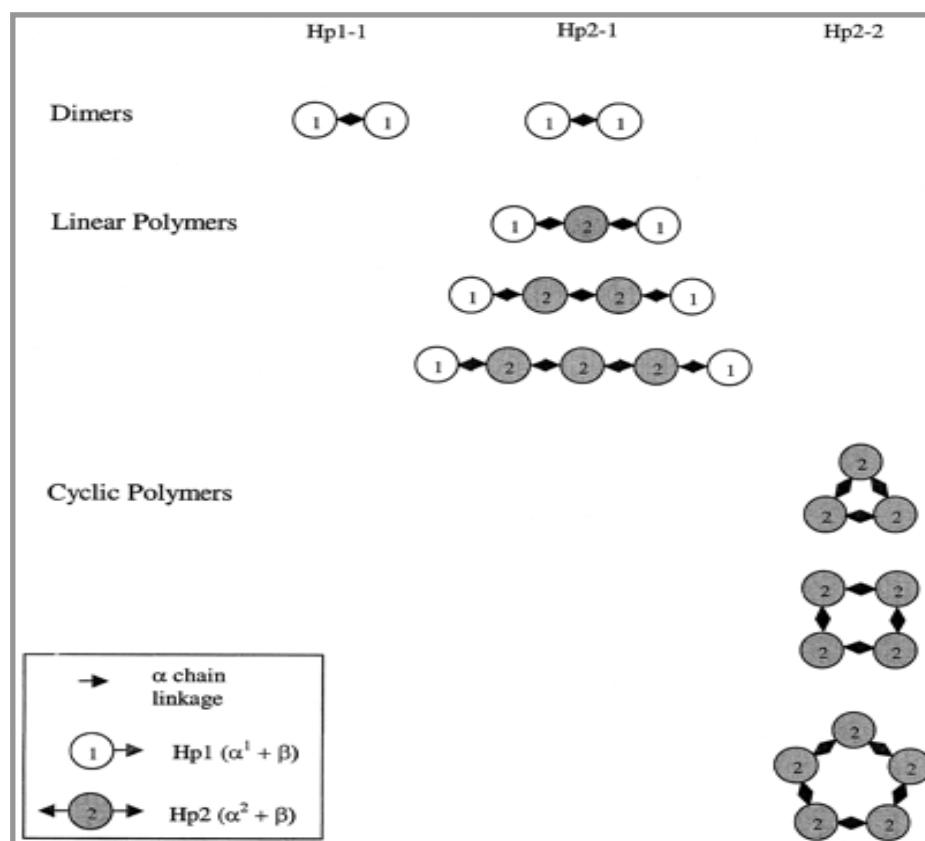


Figure 1- Schematic representation of the different protein structures for the three Hp phenotypes (adapted from Frank et al., 2001)

Haptoglobin Genes

The Hp tetramer molecule recalls that of certain immunoglobulins, as it has two light chains (α) and two heavy chains (β) covalently bound to each other by disulphide bridges (S-S) (Langlois and Delanghe, 1996; Yano et al., 1998). Although present in all vertebrates, in humans the molecule is characterized by molecular heterogeneity as the result of genetic polymorphism. In 1946, Jayle and Judas were the first researchers to suspect that there were differences between Hp molecules. In 1955, using starch gel electrophoresis, Smithies observed differences in Hp molecules in different individuals and identified the three main phenotypes: Hp1-1, Hp1-2 and Hp2-2 (Langlois and Delanghe, 1996; Devlin, 1997). In 1956, Smithies and Walker showed that these phenotypes are controlled by two autosomal codominant alleles, which were named HP1 and HP2.

In 1969, the HP *locus* was mapped to the long arm of chromosome 16 (16q22) (McGill et al., 1984). The genes corresponding to the α and β chains are linked to each other, so that a single mRNA is synthesized, generating a single, larger polypeptide chain, which is then cleaved to form the two different chains (Raugei et al., 1983; Koch et al., 2003).

The β chain has a molecular mass of 40 kDa, consists of 245 amino acids and is not genetically polymorphic. The polymorphism of human Hp reflects inherited variations in its smallest polypeptide chain, i.e., the α chain, which are the result of differences between the $\alpha 1$ chain (with 83 amino acids) and the $\alpha 2$ chain (with 142 amino acids). The $\alpha 1$ chain can be further classified into $\alpha 1S$ (slow) or $\alpha 1F$ (fast) according to the electrophoretic mobility. The difference between these chains lies in the amino acids in positions 52 and 53, which in $\alpha 1S$ are asparagine and glutamic acid and in $\alpha 1F$, aspartic acid and lysine, respectively. These base substitutions are present in exon 4 of the HP1 gene (Black and Dixon, 1968; Yano et al., 1998).

In 1962, Smithies et al. postulated that the $\alpha 2$ chain originated from an unequal crossover between two HP1 alleles; this crossover occurred between the fourth intron of an HP1F allele and the second intron of an HP1S allele (Raugei et al., 1983; Maeda, 1985). Thus the region approximately 2 kb long that is responsible for encoding from the 11th to the 69th residue of the $\alpha 1F$ chain is duplicated and its corresponding amino-acid sequence

inserted in the $\alpha 1S$ chain to form the $\alpha 2$ chain, which is almost twice as long as the $\alpha 1$ chain. Therefore, the HP2 allele has seven exons rather than the five exons present in the HP1 allele (Raugei et al., 1983; Koch et al., 2003) (**Figure 2**).

The combinations between these alleles lead to the formation of six distinct genotypes with their corresponding phenotypes: Hp1S-1S, Hp1S-1F, Hp1F-1F, Hp2-1S, Hp2-1F and Hp2-2 (Yano et al., 1998).

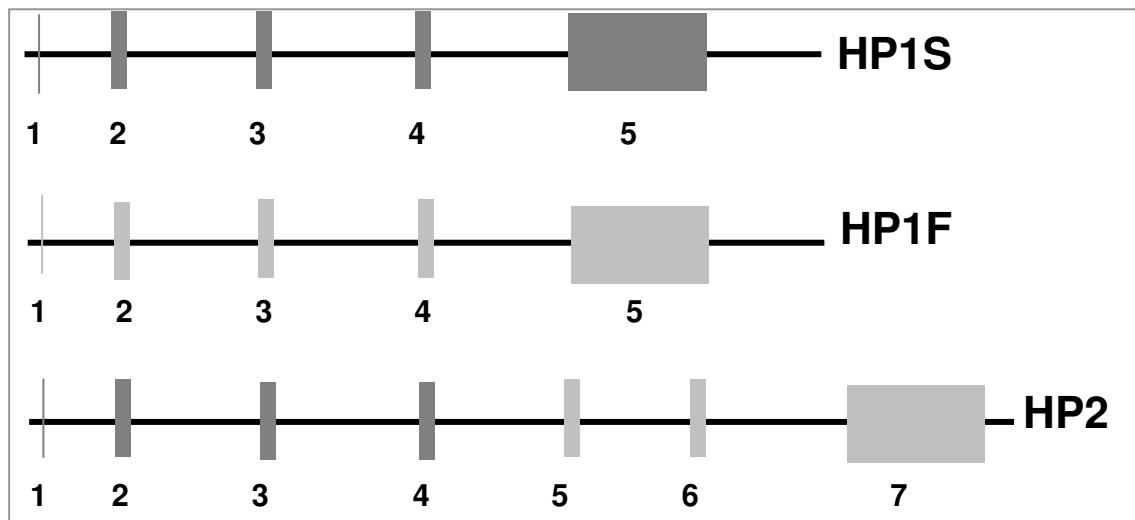


Figure 2- Schematic representation of the structure of Hp genes. The boxes indicate the exons (adapted from YANO et al., 1998).

The Haptoglobin Related Gene (HPr)

In humans and Old World monkeys, the Hp gene sequence is duplicated (2.2 kilobases downstream of the gene itself) on chromosome 16 (Maeda, 1984; Murajan et al., 1988; Wintrobe, 1988). This other gene is known as the Hp-related gene (HPr). In some individuals of African origin, multiple copies of this gene are present. The HPr gene differs from the HP gene mainly in that it has a retrovirus-type sequence inserted in the first intron; its promoting region is active and encodes a protein called haptoglobin-related protein (Hpr), which apparently has a normal structure but whose function has not yet been established (Maeda, 1984).

In 1998, Muranjan et al. estimated Hp and Hpr concentrations in sera from healthy individuals and from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In this pathology, extensive intravascular hemolysis can be observed, resulting in excess free Hb in the circulation system. As expected, the Hp levels observed in the patients were much lower than those observed in the healthy individuals, but the Hpr levels did not differ significantly, showing that Hpr does not bind to Hb. However, there is not consensus regarding these findings. Recently, when performing tests using surface plasmon resonance, Nielsen et al. (2006) observed the binding affinities of Hp and Hpr recombinant proteins for Hb. Their study showed that Hpr competes in a similar manner to Hp to bind with Hb.

High Hpr levels were also observed in the sera of some cancer patients with tumour progression, but the relevance of this observation is not yet understood (Maeda, 1985; Muranjan et al., 1988).

The HP0 Allele and Structural Variants

In most cases, the Hp0 phenotype group originates from a deletion of the Hp gene (Hp^{Del}) and is characterized by either the absence of or reduced levels of this protein in the plasma, proving that Hp is not essential for human survival (Koda et al., 1998). It may be secondary to increased consumption or reduced production of Hp, as in intravascular hemolysis and liver diseases, respectively, or be genetically determined (Delanghe et al., 1998; Koda et al., 2000).

Following PCR and Southern blot analysis, genetically determined hypohaptoglobinemia was described as the result of the deletion of approximately 28 kb (**Figure 3**) involving the whole gene and part of the Hpr gene. The homozygous deletion ($\text{Hp}^{\text{Del}}/\text{Hp}^{\text{Del}}$) corresponds to the complete absence of serum Hp whereas the two forms of hypohaptoglobinemia ($\text{Hp2}/\text{Hp}^{\text{Del}}$ genotype and $\text{Hp1}/\text{Hp}^{\text{Del}}$ genotype) are associated with extremely low levels of Hp and levels that are approximately 50% of those observed in normal genotypes, respectively (Koda et al, 2000). The Hp^{Del} deletion is most common in

Asian populations, in which the frequency of Hp0 is as high as 40%. This deletion has not been detected in African or European populations (Teye et al., 2004). The prevalence of the Hp0 phenotype in Caucasians is estimated to be in the region of 0.1% (Langlois and Delanghe, 1996).

In 2003, Teye et al. investigated the genetic basis for the HP0 phenotype in an African population in Ghana. One hundred and twenty-three individuals were studied, and 17 were found to have the HP0 phenotype. Of these, eight were classified as hypohaptoglobinemic and nine as ahaptoglobinemic. By sequencing the HP gene, three previously known base substitutions (A-55G, A-61C and T-104A) and three new substitutions (C-101G, T-191G and C-242T) were found within the 5'-flanking region of the HP gene. The A-61C and C-101G mutations were both related to transcription of the protein, but the first was associated with ahaptoglobinemia whereas the second was associated with hypohaptoglobinemia. While the T-191G and C-242T substitutions were observed in individuals with normal plasma Hp concentrations, not all individuals with the HP0 phenotype had mutations, suggesting a multifactorial pattern of expression.

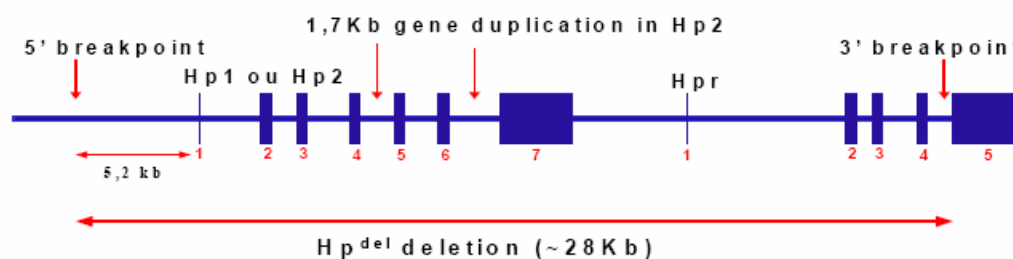


Figure 3- Schematic representation of the Hp^{Del} deletion. The boxes indicate the Hp and Hpr exons. (adapted from Koda et al., 2000).

Structural variants of Hp are described in the literature. Hp Carlberg was identified in 1958 and is associated with reduced synthesis of the α 1S chain. In starch gel electrophoresis, this protein migrates with a pattern similar to that of Hp2 but with two or

more extra bands (Bowman and Kennedy, 1982). Modified Hp2-1 (Hp2-1M) has a different electrophoretic pattern from that of the Hp2-1 phenotype as it has a greater number of Hp1 bands, which are heavier and more intense. This phenotype emerged as the result of the polymorphism of a single nucleotide in the promoting region of the HP2 gene and is more frequent in African populations (Maeda, 1991; Quaye et al., 2006). In 1959, Giblett found that the prevalence of this phenotype in North American Negroes in the Seattle region was 9.8%. In 1969, Azevedo et al. studied a population of 541 Negroes from the Northeast of Brazil and found an association between the HP^{α2M} allele and the presence of hypohaptoglobinemia (Azevedo et al., 1969). The rare Hp Johnson is the result of a crossover between the two Hp2 alleles and causes hypohaptoglobinemia or ahaptoglobinemia. The electrophoretic pattern of this phenotype consists of the Hp1 band and various polymers that migrate slowly (Bowman and Kurosky, 1982; Langlois and Delanghe, 1996).

GEOGRAPHIC DISTRIBUTION OF HP ALLELLES

There is a noticeable variation in the frequency of Hp genes with geographic region. The HP1 allele is observed less frequently in the southeast of Asia, and the highest frequency is observed in Africa and South America. It is believed that the HP2 allele originated in India approximately 2 million years ago and propagated around the world as a result of intense genetic pressure, gradually replacing the hegemony of the HP1 allele. This suggests that the HP2 allele has a selective advantage over the HP1 allele. The frequency of the latter can be observed to increase from Asia to America, by way of Alaska, and the largest value is found in the indigenous population of Chile.

The equilibrium of the HP1/HP2 polymorphism remains broadly constant throughout the world's population. The allele frequency in the European population is approximately 0.43 for the HP1 allele and 0.57 for the HP2 allele; in the United States of America, the respective figures are approximately 0.54 and 0.46 (Langlois and Delanghe, 1996).

FUNCTIONAL PROPERTIES OF HAPTOGLOBIN

The different Hp genotypes/phenotypes have different biochemical and biophysical characteristics and functional efficiencies, which would explain why they appear to have distinct anti-oxidative and immunomodulatory capacities (Wassel, 2000; Frank et al., 2001).

Anti-oxidative Capacity

When Hb is released from red blood cells it becomes highly toxic, as it mediates iron-driven oxidative stress and inflammation (Tseng et al., 2004).

As previously mentioned, the main physiological role of Hp is to remove the free Hb found in plasma as a result of intravascular hemolysis. Hp and Hb bind to each other to form an essentially irreversible, non-covalent, soluble complex characterized by its high stability and affinity ($>10^{10} \text{ mol}^{-1}$). Some studies suggest that the β chain in human Hb contains two specific Hp-binding sites (residues $\beta 11-25$ and $\beta 131-146$) whereas the α chain only has one Hp-binding site (residues $\alpha 121-127$) (Langlois and Delanghe, 1996). The Hb $\alpha\beta$ dimers bind stoichiometrically to the $\alpha\beta$ subunits of the Hp.

Hp in the circulation system reaches saturation when 500-1500mg/L of free Hb is present in the plasma. The half-life of the complex in plasma is approximately 20 minutes (Langlois and Delanghe, 1996; Van Vlierberghe et al., 2004).

After red blood cells have been destroyed, the free Hb in the circulation system is eliminated by glomerular filtration, and this can cause renal damage. Hp reduces Hb and iron loss because the Hp-Hb complex is not filtered through the glomeruli (Langlois and Delanghe, 1996; Devlin, 1997; Van Vlierberghe et al., 2004). Once formed, it is quickly removed from the circulation system and transported to two other locations: 90% to the hepatocytes and 10% to the tissue monocytes/macrophages. The specific receptor for the Hp-Hb complex in hepatocytes has not yet been cloned or characterized, but it is known to have a high binding affinity for the complex. This receptor appears to recognize the conformational change in Hp caused by formation of the complex with Hb. The receptor for this complex in macrophages was recently identified and denominated CD163

(Kristiansen et al., 2001; Horn et al., 2003). After endocytosis, the complex is broken down by lysosomes. Hp is not recycled; the heme, however, is broken down by the heme oxygenase enzyme (HO) and releases iron, which is taken to locations where it can be reused to synthesize other proteins (Hb, for example) as well as biliverdin, which is subsequently converted into bilirubin (Wagener et al., 2003; Van Vlierberghe et al., 2004) (**Figure 4**). IL-6 plays a very important regulatory role here: as well as stimulating Hp production, it also increases the expression of the CD163 receptor on macrophage surfaces and increases the efficiency with which the Hb heme group is broken down (Dennis, 2001).

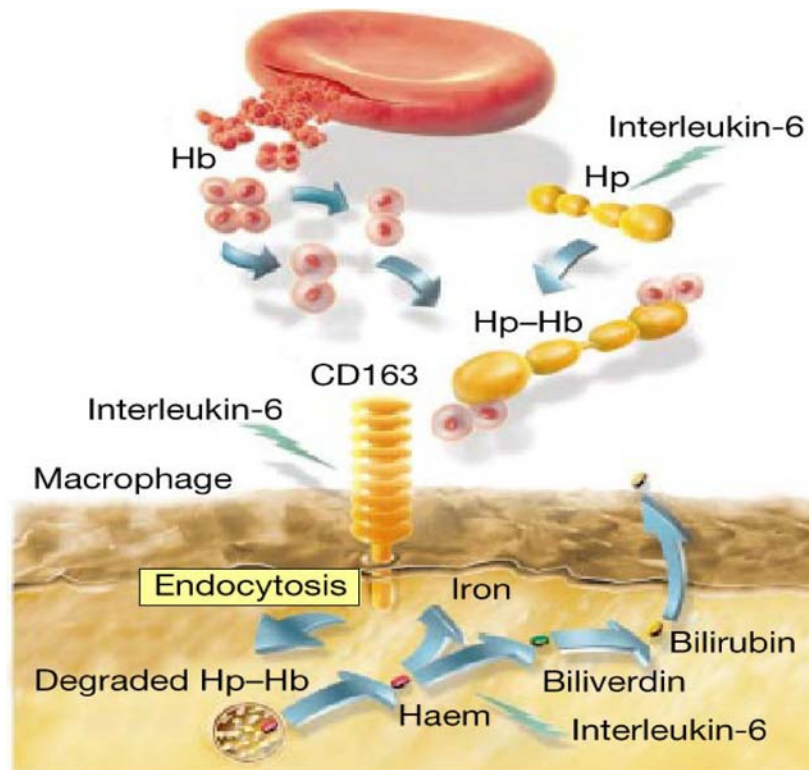


Figure 4- Schematic representation of endocytosis of the Hp-Hb complex by a macrophage (adapted from Dennis, 2001).

The most important function of Hp is believed to be to act as an anti-oxidant through its ability to prevent the oxidative effects of heme iron mediated by free Hb, which damage the tissues. This can be explained by the fact that Hp binds to iron, thus preventing the iron heme dissociating from Hb. According to the Fenton reaction, free iron can react

with oxygen to generate a toxic superoxide radical and with H₂O₂ to generate another toxic radical called a hydroxyl radical (Kaplan, 2002). This free iron can also catalyze oxidation of low-density lipoproteins, which can then damage the cells of the vascular endothelium.

The ability of Hp to reduce the harm caused by free radicals is phenotype dependent (Van Vlierberghe et al., 2004). Some experiments have shown that there is a functional difference between the antioxidant capacity of purified Hp produced by different alleles. The Hp1-1 protein was found to confer greater protection in vitro against oxidative damage than the Hp2-2 protein (Koda et al., 1998).

Studies have shown that the three main Hp phenotypes have the same binding affinities for Hb (Bowman and Kennedy, 1982; Frank et al., 2001). Therefore, the difference in the abilities of Hp1-1 and Hp2-2 to inhibit oxidation may be the result of their different abilities to prevent heme being released due to their distinct sizes. Hp2-2 protein removes iron to the extravascular space more slowly because it is a more complex molecule. Thus, free Hb remains in the vessel for longer, resulting in greater oxidative stress (Frank et al., 2001).

Immunomodulatory Capacity

The response of Hp to inflammatory, infectious and tumour processes as a positive reagent during the acute phase suggests that it has an additional function. Studies have shown that Hp has immunoregulatory properties, with Hp2-2 individuals found to have more intense immunological reactivity than Hp1-1 and Hp1-2 individuals and to produce more antibodies after vaccination (Langlois and Delanghe, 1996). In addition, Hp is an inhibitor of prostaglandin synthesis and consequently has important anti-inflammatory properties. However, these were found to be less pronounced in individuals with an Hp2-2 phenotype (Langlois and Delanghe, 1996; Braeckman et al., 1999).

Consensus was reached regarding the powerful suppressive effect on lymphocyte function exerted by Hp, reflected in the protein's inhibition of the mitogenic response of lymphocytes to phytohemagglutinin and concanavalin A. Different T helper (Th)

lymphocyte subtypes, known as Th1 and Th2, are responsible for inducing and regulating the cellular and humoral immune response, respectively. Th1 cells produce IL-2 and gamma interferon (IFN- γ) and induce strong IgG responses, thus favouring the cellular immune response, whereas Th2 cells produce IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 and IL-13 and increase IgE production, thereby mediating a predominantly humoral and eosinophilic response (Abbas and Lichtman, 2003). Arredouani et al. (2003) showed that Hp plays an important role in modulating the balance between Th1 and Th2 lymphocytes (Th1/Th2) by promoting a predominantly cellular Th1 response, which has a more protective effect on infections involving intracellular parasites, and, consequently, inhibiting release of Th2 cytokines responsible for defence against extracellular microorganisms. In 2005 the same authors reported that Hp modulated the inflammatory response selectively, as it is able to suppress synthesis of TNF- α , IL-10 and IL-12 by monocytes stimulated by lipopolysaccharides (LPS) (Arredouani et al., 2005). In 2006 Guetta et al. showed that Hp1-1-Hb induces much greater IL-6 and IL-10 production than Hp2-2-Hb and that release of these cytokines is dependent on these complexes binding to the CD163 receptor of the macrophages and on casein kinase II (CKII) activity. In their study, the enzyme's action was found to be differentially modulated by the type of binding to the different Hp-Hb complexes in the CD163 receptor. The authors suggest that Hp1-1 individuals have increased vascular protection compared with that of Hp2-2 individuals because they modulate the Th1 and Th2 cytokines produced by the macrophages differently (Guetta et al., 2006).

HP POLYMORPHISM AND DISEASES

The functional differences arising from Hp genetic polymorphism have led several researchers to investigate the influence of the Hp subtypes on different human pathologies.

Cardiovascular Disorders

The association between Hp phenotypes/genotypes and heart disease has been investigated for many years. One study demonstrated a significant increase in the incidence of the phenotype Hp 2-2 in the high-risk group of cardiac patients, as compared to a group of healthy subjects (Gogishvile et al., 1985). Chapelle et al. in 1982 showed that after a myocardial infarction, the severity and extent of damages were greater in patients with Hp2-2 than in those with Hp1-1 or Hp2-1. In addition, the survival time in patients with Hp2-2 who have undergone coronary artery bypass graft is shorter than for patients with other Hp phenotype (Delanghe et al., 1997). The phenotype Hp2-2 protects less against oxidative stress in arterial vessels in patients with the presence of atherosclerotic plaques and it is considered a risk factor for developing refractory hypertension: these patients require more combinations of antihypertensive drugs to control blood pressure (Delanghe et al., 1995). Indeed, serum cholesterol levels in individual with Hp2-2 are higher than individual with other Hp phenotypes (Braeckman et al., 1999).

The association between Hp phenotypes and peripheral blood disorders has been investigated. The Hp2-2 phenotype is more common in peripheral occlusive disorders. Curiously, individuals with Hp2-2 who have subjected to a treadmill stress test reported longer maximal walking distance than individuals with other Hp phenotype and these results might have been due to more potent angiogenic activity (Delanghe et al., 1999). These different functions and biological capacity of Hp may be used as a predictor of susceptibility to cardiovascular disorders and patient prognosis.

Diabetes Mellitus (DM)

The increased oxidative stress that occurs in diabetic patients results in oxidation of glucose and modification of the low-density lipoproteins (LDL), which may stimulate production of various inflammatory cytokines that are implicated in the morphological and pathological changes found in macrovascular and microvascular complications (Giugliano and Ceriello, 1996; Levy, 2003).

In recent studies into the antioxidant properties of Hp in diabetic patients, differing degrees of susceptibility to the development of vascular problems were observed, with Hp 1-1 individuals appearing to be better protected against this type of disease than Hp 2-1 and Hp 2-2 individuals. The same studies concluded that the differences in oxidative capacity were not due to differences in affinity between Hp subtypes and the Hb molecule, but that, probably because of its smaller size and structure, Hp1 can pass more easily through the endothelial barrier and penetrate into extravascular spaces. Thus, Hp 1-1 individuals appear to be better protected from oxidative stress than Hp 2-1 and 2-2 individuals (Levy and Skorecki, 2000; Nakhoul et al., 2001; Asleh et al., 2003; Levy et al., 2004; Mustafa et al., 2004).

Levy et al. (2002) determined the Hp phenotype in type 2 DM patients with macrovascular complications and normal individuals. They concluded that diabetic patients with an Hp 2-2 phenotype are five times more likely to have cardiovascular complications than those with an Hp 1-1 phenotype. An intermediate risk was associated with the Hp 2-1 phenotype. In the same direction, Hp1-1 seems to protect against restenosis after coronary stent implantation in diabetic patients (Roguin et al., 2002). Yet, Hp2-2 has been showed to be associated with microvascular complications in both types of DM. However, there is no consensus regarding these findings.

Hematologic Disorders

The high Hp2-2 frequency has been described among patients with retinal hemorrhage (Padma and Murty, 1983). On the other hand, Hp1-1 seems to be associated with sickle cell disease, acute and chronic myeloid leukaemia, and acute lymphoid leukaemia (Langlois and Delanghe, 1996).

Infectious Diseases

Tuberculosis patients with Hp2-2 phenotype have a higher risk of mortality and susceptibility to severe nephrotic tuberculosis (Kasvosve et al., 2000). Furthermore, Hp2-2 is overrepresented among patients with advanced tuberculosis (Fedoseeva et al., 1993).

In HIV infection, residual iron circulating in the plasma could enhance the hemoglobin driven oxidative stress, favoring viral replication and transmission. HIV-infected patients with phenotype Hp2-2 have been showed higher mortality rate and a worse prognosis than patients with other phenotypes (Delanghe et al., 1998).

In patients with hepatitis C, Hp1-1 is overrepresented. Interestingly, individuals with Hp2-2 after vaccination to hepatitis B have demonstrated lower antibody levels than those with Hp1-1 or Hp2-2 (Louagie et al., 1993). However, individuals with Hp2-2 have a stronger antibody response to typhus and tetanus vaccination (Langlois and Delanghe, 1996).

HP POLYMORPHISM IN BRAZILIAN POPULATIONS

In Brazil, a few studies have investigated the association between the Hp polymorphism and human pathologies. Beiguelman et al. (2003), in the study with the western Amazonian population, did not detect any significant association between Hp phenotypes and infection by Plasmodium. In 2004, Campregher et al. investigated Hp phenotypes in Brazilian leukaemia patients to determine whether there was an association between the four main types of leukaemia (acute myeloid leukaemia, chronic myeloid leukaemia, acute lymphocytic leukaemia and chronic lymphocytic leukaemia) and the Hp1 gene but were unable to confirm this association, which had been previously suggested in the literature (Nevo and Tatarski, 1986; Mitchell et al., 1988). Only ahaptoglobinemia was found to have a higher prevalence among the patients. In 2006, Calderoni et al investigated if any Hp phenotype could be associated with any of the various clinical forms of American trypanosomiasis. This study involved patients suffering from the indeterminate, chronic cardiac, chronic digestive or chronic 'combined' (i.e. cardiac plus digestive) forms of the disease and healthy blood donors. The authors found that the Hp2-2 phenotype was much more frequent in the patients with any form of American trypanosomiasis, in patients with the indeterminate form of the disease and in patients with the chronic combined form. These results may indicate some role of this phenotype in the pathogenesis of the disease. A recent study was carried out by Zaccariotto et al. (2006), which aimed to compare the

distribution of the main Hp genotypes among HIV-seropositive patients and healthy HIV-seronegative individuals from the Southeast of Brazil and to correlate these genotypes with iron “status”, acute-phase serum protein concentrations, T-CD4+ lymphocyte counts and patient viral load. Their results failed to show that Hp genotypes had any significant influence on the susceptibility to HIV infection or on the clinical outcome of patients suffering from the disease in the population studied. Wobeto et al (2007), investigating the existence of correlation between Hp subtypes and diabetic retinopathy, determinate the Hp genotype frequencies of DM-type 1 and DM-type 2 patients attended at the Unicamp University Hospital. No significant differences could be observed for the three Hp genotypes.

REFERENCES

- Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. Fifth edition. USA: Ed. Saunders; 2003.p.65-274.
- Asleh R, Marsh S, Shilkrot M, Binah O, Guetta J, Lejbkowitz F, et al. Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circ Res* 2003; 92:1193-1200.
- Arredouani M, Matthijs P, Hoeyveld V, Kasran A, Baumann H, Ceuppens JL. Haptoglobin directly affects cells and suppress T helper cell type 2 cytokine release. *Immunol* 2003; 108: 144-151.
- Arredouani M, Kasran A, Vanoirbeek JA, Berger FG, Baumann H, Ceuppens JL. Haptoglobin dampens endotoxin-induced inflammatory effects both in vitro and in vivo. *Immunol* 2005; 114:63-271.
- Awadallah SM, Atoum MF. Haptoglobin polymorphism in breast cancer patients from Jordan. *Clin Chim Acta* 2004; 341:17-21.
- Azevedo E, Krieger H, Morton NE. Ahaptoglobinemia in Northeastern Brazil. *Hum Hered* 1969; 19:603-612.

Beiguelman B, Alves FP, Moura MM, Engracia V, Nunes ACS, Heckmann MIO, et al. The association of genetic markers and malaria infection in the Brazilian western amazonian region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:445-460.

Black JA, Dixon GH. Amino-acid sequence of alpha chains of human haptoglobin. *Nature* 1968; 218:736-741.

Bowman BH, Kurosky A. Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossover, and point mutation. *Adv Hum Genet* 1982; 12:189-261.

Braeckman L, Bacquer DD, Delanghe J, Claeys L, Backer GD. Association between haptoglobin polymorphism, lipids, lipoproteins and inflammatory variables. *Atherosclerosis* 1999; 143:383-388.

Campregher PV, Metze IL, Grotto HZW, Sonati MF. Haptoglobin phenotypes in Brazilian patients with leukemia. *J Bras Pat Med Lab* 2004; 40:307-309.

Chapelle JP, Albert A, Smeets JP, Heusghem C, Kulbertus HE. Effect of the haptoglobin phenotype on the size of a myocardial infarct. *N Engl J Med* 1982; 307:457-463.

Delanghe J, Cambier B, Langlois M, De buyzere M, Neels H, De Bacquer D. Haptoglobin polymorphism, a genetic risk factor in coronary artery bypass surgery. *Atherosclerosis* 1997; 132:215-219.

Delanghe J, langlois M, Duprez D, De Buyzere M, Clement D. Haptoglobin polymorphism and peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis* 1999; 145:287-292.

Delanghe JR, Langlois MR, Buyzereache MD. Congenital anhaptoglobinemia versus hypohaptoglobinemia. *Blood* 1988; 91(9):3254.

Delanghe JR, Langlois MR, Boelart JR, Van Acker J, Van Wanzeele F, van der Groen G, et al. Haptoglobin polymorphism, iron metabolism and mortality in HIV infection. *AIDS* 1998; 12:1027-1032.

Dennis C. Haemoglobin scavenger. *Nature* 2001; 409(6817):141-143.

Devlin TM. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Fourth edition. USA: Ed. Wiley-Liss; 1997.p.1020-1021.

Dobryszczycka W. Biological functions of haptoglobin-new pieces to an old puzzle. *Eur J Chem Clin Biochem* 1997; 35(9):647-54.

- Fedoseeva SV, Iusopova MM, Chukanova VP, Pospelov LE. Course of infiltrating pulmonary tuberculosis depending on the patient's genotype. *Probl Tuberk* 1993; 2:8-10.
- Frank MM, Lache O, Enav BI, Szafrank T, Levy NS, Ricklis RM. Structure-function analysis of antioxidant properties of haptoglobin. *Blood* 2001; 98:3693-3698.
- Frank MM, Lache O, Enav BI, Szafrank T, Levy RM, Levy AP. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood* 2001; 98:3693-3698.
- Giugliano D, Ceriello A. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19:247-263.
- Gogishvili AV, Kavtaradze VG, Mamaladze GT, Arutiunova MS, Takadze GSh. Haptoglobin phenotype distribution in patients at high risk of developing myocardial infarct. *Kardiologiia* 1985; 25:55-58.
- Guetta J, Strauss M, Levy NS, Fahoum L, Levy AP. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis* 2006 (*in press*).
- Hillman RS, Finch CA. *Red Cell Manual*. Sixth edition: USA: Ed. F.A Davis Company; 1992.p.1-147.
- Horn IR, Nielsen MJ, Madsen M, Jacobsen C, Graversen JH, Moestrup SK, et al. Generation of a haptoglobin-hemoglobin complex-specific Fab antibody blocking the binding of the complex to CD163. *Eur J Haematol* 2003; 71:289-293.
- Kaplan J. Strategy and tactics in the evolution of iron acquisition. *Semin Hematol* 2002;39:219-266.
- Kasvosve I, Gomo ZA, Mvundura E, Moyo VM, Saungweme T, Khumalo H, et al. Haptoglobin polymorphism and mortality in patients with tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 8:771-775.
- Koch W, Latz W, Eichinger M, Roguin A, Levy AP, Schomig A. Genotyping of the common haptoglobin Hp1/2 polymorphism based on PCR. *Clin Chem* 2002; 48(9):1377-1382.
- Koch W, Latz W, Eichinger M, Roguin A, Levy AP, Schomig A. Haptoglobin gene subtyping by restriction enzyme analysis. *Clin Chem* 2003; 49(11):1937-1940.

- Koda Y, Soejima M, Yoshioka N, Kimura H. The haptoglobin-gene deletion responsible for anhaptoalbuminemia. *Am J Hum Genet* 1998; 62:245-252.
- Koda Y, Watanabe Y, Soejima M, Shimada E, Nishimura M, Morishita K, et al. Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in anhaptoalbuminemic patients with anti-haptoglobin antibody that causes anaphylactic transfusion reactions. *Blood* 2000; 95: 1138-1143.
- Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SKA, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001; 409:198-201.
- Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 1996; 42:1589-1600.
- Levy AP, Skorecki K. Haptoglobin phenotype and vascular complications in patients with diabetes. *N Engl J Med* 2000; 343:969-970.
- Levy AP, Hochberg I, Jablonski K, Resnick H, Lee ET, Best L, et al. Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: The strong heart study. *JACC* 2002; 40: 1984-1990.
- Levy AP. Genetics of diabetic cardiovascular disease: identification of a major susceptibility gene. *Acta Diabetol* 2003; 40:S330-S333.
- Louagie H, Delanghe J, Desombere I, De Buyzere M, Hauser P, Leroux-Roels G. Haptoglobin polymorphism and the immune response after hepatitis B vaccination. *Vaccine* 1993; 11:1188-1190.
- Maeda N, Yang F, Barnett DR, Bowman BH, Smithies O. Duplication within the haptoglobin Hp2 gene. *Nature* 1984; 309:131-135.
- Maeda N. Nucleotide sequence of the haptoglobin and haptoglobin-related gene pair. *J Biol Chem* 1985; 260:6698-6709.
- Maeda N. DNA polymorphisms in the controlling region of the human haptoglobin genes: a molecular explanation for the haptoglobin 2-1 modified phenotype. *Am J Hum Genet* 1991; 49:1958.

- McGill JR, Yang F, Baldwin WD, Brune JL, Barnett DR, Bowman BH. Localization of the haptoglobin alpha and beta genes to human chromosome 16q22 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1984; 38(2):155-157.
- Mitchell RJ, Carzino R, Janardhana V. Association between the two serum proteins haptoglobin and transferrin and leukemia. *Hum Hered* 1988; 38:144-150.
- Murajan M, Nussenzweig V, Tomlinson S. Characterization of the human serum trypanosome toxin, haptoglobin related protein. *J.Biol.Chem* 1998; 273:3884-3887
- Nevo S, Tatarsky I. Serum haptoglobin types and leukemia. *Hum Hered* 1986; 73:240-244.
- Nielsen MJ, Petersen SV, Jacobsen C, Oxvig C, Rees D, Moller HJ, et al. Haptoglobin-related protein is a high-affinity hemoglobin binding plasma protein. *Blood* 2006; 108:2846-2849.
- Padma T, Murty JS. Association of genetic markers with some eye diseases. *Acta Antropogenet* 1983; 1:1-12.
- Polonovski M, Jayle MF. Existence dans le plasma sanguin d'une substance activant l'action peroxydasique, l'haptoglobine. *C.R. Soc. Biol* 1938; 129:457-460.
- Quaye IK, Ababio G, Amoah AG. Haptoglobin 2-2 phenotype is a risk factor for type 2 diabetes in Ghana. *J Atheroscler Thromb* 2006; 13:90-94.
- Raugei G, Bensi G, Colantuoni V, Romano V, Santoro C, Costanzo F, et al. Sequence of human haptoglobin cDNA: evidence that the α and β subunits are coded by the same mRNA. *Nuc Acids Res* 1983; 11(17):5811-5819.
- Roguim A, Ribichini F, Ferrero V, Matullo G, Herer P, Wijns W, et al. Haptoglobin phenotype and the risk of restenosis after coronary artery stent implantation. *Am J Cardiol* 2002; 7:806-810.
- Sadrzadeh SM, Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am J Clin Pathol* 2004; 121 Suppl:S97-104.
- Santoro C, Boccazzi C, Carbonara AO. A simplified procedure for haptoglobin subtyping. *Hum Genet* 1982; 60:287-288.

- Simões AL, Kompf J, Ritter H, Luckenbach C, Zischler H, Salzano FM. Electrophoretic and isoelectric focusing studies in Brazilian Indians: data on four systems. *Hum Biol* 1989; 61:427-438.
- Teye K, Quaye IKE, Koda Y, Soejima M, Tsuneoka M, Pang H, et al. A-61C and C-101G Hp gene promoter polymorphism are, respectively, associated with ahaptoglobinaemia and hypohaptoglobinaemia in Ghana. *Clin Genet* 2003; 64:439-443.
- Teye K, Quaye IKE, Koda Y, Soejima M, Pang H, Tsuneoka M, et al. A novel 1247T missense mutation in the haptoglobin 2 β -chain decreases the expression of the protein and is associated with ahaptoglobinaemia. *Hum Genet* 2004; 114:499-502.
- Tseng CF, Lin CC, Huang HY, Liu HC, Mao SJT. Antioxidant role of human haptoglobin. *Proteomics* 2004; 4:2221-2228.
- Van Vlierberghe H, Langlois M, Delanghe J. Haptoglobin polymorphism and iron homeostasis in health and in disease. *Clin Chim Acta* 2004; 345:35-42.
- Wagener FADT, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GA, et al. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmac Rev* 2003; 55(3):551-571.
- Wassel J. Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin Lab* 2000; 46(11-12):547-52.
- Wintrobe MM. *Hematologia Clínica*. São Paulo: Ed. Manole Ltda;1998.p.208-238.
- Wobeto VPA, Rosim ET, Melo MB, Calliari LEP, Sonati MF. Haptoglobin polymorphism and diabetic retinopathy in Brazilian patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2007 (*in press*).
- Yano A, Yamamoto Y, Miyaishi S, Ishizu H. Haptoglobin genotyping by allele-specific polymerase chain reaction amplification. *Acta Med Okayama* 1998; 52(4):173-181.
- Zaccariotto TR, Rosim ET, Melo D, Garcia PMD, Munhoz, RR, Aoki F.H, et al. Haptoglobin polymorphism in a HIV-1-seropositive Brazilian population. *J Clin Pathol* 2006; 59:550-553.