

# Genotipo de la haptoglobina y riesgo de nefropatía diabética en pacientes con diabetes mellitus tipo 1: estudio en población española

Antonio J. Amor<sup>1</sup>, Silvia Canivell<sup>2</sup>, Josep Oriola<sup>3</sup>, Maria J. Ricart<sup>4</sup>, Ana M. de Hollanda<sup>1</sup>, Anna Bosch-Comas<sup>5</sup>, Enric Esmatjes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Diabetes. Servicio de Endocrinología y Nutrición, IDIBAPS, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM). Hospital Clínic i Universitari de Barcelona

<sup>2</sup> Diabetes and Obesity Laboratory. Endocrinology and Nutrition Unit. IDIBAPS/CIBERDEM. Hospital Clínic i Universitari de Barcelona.

<sup>3</sup> Servicio de Bioquímica y Genética Molecular. Hospital Clínic i Universitari de Barcelona

<sup>4</sup> Unidad de Trasplante Renal. Hospital Clínic i Universitari de Barcelona

<sup>5</sup> Biobank. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Barcelona

Nefrología 2014;34(2):212-5

doi:10.3265/Nefrologia.pre2014.Feb.12034

## RESUMEN

**Antecedentes:** Pocos trabajos han estudiado la asociación entre el genotipo de la haptoglobina (Hp) y el riesgo de nefropatía diabética (ND) en pacientes con diabetes tipo 1 (DM1), con resultados contradictorios hasta ahora. **Objetivos:** Estudiar si el genotipo 2-2 de Hp se asocia a un incremento del riesgo de ND en población española con DM1. **Métodos:** Se diseñó un estudio de casos y controles. **CASOS:** pacientes con DM1 y enfermedad renal crónica estadio 5 de la NKF-KDOQI, en espera de trasplante reno-pancreático o que han sido trasplantados (reno-pancreático o renal aislado). **CONTROLES:** pacientes con DM1, apareados por sexo y tiempo de evolución de la diabetes, con función renal y excreción urinaria de albúmina normales. El genotipo de Hp se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis. **Resultados:** Incluimos 57 casos y 57 controles, sin diferencias estadísticamente significativas en el sexo (70 % frente a 61 % varones,  $p = 1,0$ ) o duración de la diabetes ( $23,0 \pm 6,7$  frente a  $20,8 \pm 9,3$  años;  $p = 0,1$ ), aunque la edad de inicio de la diabetes fue menor en los casos ( $14,1 \pm 6,8$  frente a  $17,7 \pm 10,1$  años,  $p = 0,03$ ). La frecuencia de genotipos 1-1, 1-2 y 2-2 fue de 19,3 %, 42,1 % y 38,6 % en los casos y de 17,5 %, 49,1 % y 33,4 % en los controles, respectivamente, sin diferencias significativas ( $p = 0,8$ ). El análisis de regresión logística condicional no mostró asociación entre el genotipo 2-2 de Hp y el desarrollo de ND (OR 1,14, IC 0,52-2,52). **Conclusiones:** En nuestra muestra de población española con DM1, no se ha hallado asociación entre el genotipo de Hp y el riesgo de ND.

**Palabras clave:** Diabetes mellitus tipo 1. Nefropatía diabética. Enfermedad renal crónica terminal. Genotipo de haptoglobina.

## Haptoglobin genotype and risk of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus: a study on a Spanish population

### ABSTRACT

**Background:** Few reports have studied the possible association between the haptoglobin (Hp) genotype and the risk of diabetic nephropathy (DN) in type 1 diabetes (T1D), with conflicting results to date. **Aims:** To study whether the 2-2 Hp genotype is associated with an increased risk of overt DN in a Spanish population with T1D. **Methods:** We performed a case-control study in a Spanish population. **CASES:** T1D patients with end-stage renal disease (stage 5 of NKF-KDOQI), awaiting reno-pancreatic transplantation or having already been transplanted (reno-pancreatic or renal alone). **CONTROLS:** T1D patients, matched for sex and time of diabetes evolution, with preserved renal function and normal urinary albumin excretion. Hp genotyping was done using polymerase chain reaction and electrophoresis. **Results:** We included 57 cases and 57 controls in the study. There were no statistically significant differences in gender (70% vs. 61% males,  $p=1.0$ ) or the duration of diabetes ( $23.0 \pm 6.7$  vs.  $20.8 \pm 9.3$  years;  $p=0.1$ ), although the age of onset of diabetes was lower in the cases ( $14.1 \pm 6.8$  vs.  $17.7 \pm 10.1$  years,  $p=0.03$ ). The frequency of genotypes 1-1, 1-2 and 2-2 was 19.3%, 42.1% and 38.6% in cases and 17.5%, 49.1% and 33.4% in controls, respectively, with no statistically significant differences between groups ( $p=0.8$ ). Conditional logistic regression analysis showed no significant association between genotype 2-2 of Hp and the development of DN (OR 1.14, CI 0.52-2.52). **Conclusions:** In our sample of a Spanish population with T1D, no association was found between the Hp genotype and risk of overt DN.

**Keywords:** Type 1 diabetes. Diabetic nephropathy. End-stage renal disease. Haptoglobin genotype.

## Correspondencia: Enric Esmatjes

Unidad de Diabetes. Servicio de Endocrinología y Nutrición. IDIBAPS, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas asociadas (CIBERDEM). Hospital Clínic i Universitari de Barcelona. Villarroel, 170. 08036 Barcelona. esmatjes@clinic.ub.es

## INTRODUCCIÓN

La haptoglobina (Hp) es una proteína que actúa como antioxidante debido a su capacidad para unirse a la hemoglobina y

prevenir el daño tisular provocado por esta en su forma libre. El gen de la Hp es polimórfico, con dos tipos de alelos, denominados 1 y 2, resultando en tres genotipos potenciales de la Hp: Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2<sup>1</sup>. La proteína derivada del alelo 2 de la Hp confiere una actividad antioxidante menor que la proteína del alelo 1<sup>1,2</sup>.

Cada vez hay más evidencias en la literatura médica de la asociación entre el genotipo de la Hp y la enfermedad cardiovascular (ECV)<sup>3</sup>. En este sentido, varios estudios epidemiológicos longitudinales han encontrado un riesgo de 2 a 8 veces mayor de ECV en pacientes con diabetes mellitus con el genotipo 2-2 de la Hp, tanto en diabetes mellitus tipo 1 (DM1) como en tipo 2 (DM2)<sup>4-7</sup>.

La asociación entre el genotipo de la Hp y las complicaciones microvasculares en la diabetes ha sido menos estudiada. Hasta ahora, pocos estudios se han centrado en las implicaciones de la Hp en el riesgo de nefropatía diabética (ND), usando poblaciones heterogéneas de pacientes con DM1, con resultados contradictorios hasta la fecha<sup>8-11</sup>.

Con estos precedentes, el objetivo de nuestro trabajo es estudiar si el genotipo 2-2 de la Hp se asocia a un incremento del riesgo de ND en población española con DM1.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseñó un estudio de casos y controles en población española. Todos los pacientes fueron seleccionados de la base de datos del Biobank (banco de ADN) del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) y Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), una infraestructura técnica y científica que coordina la obtención, procesamiento, almacenaje y provisión de muestras biológicas ([http://www.clinicbiobanc.org/en\\_index.html](http://www.clinicbiobanc.org/en_index.html)). Los casos se definieron como todos los pacientes registrados en el Biobank con DM1 y enfermedad renal crónica estadio 5 de la National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative, en espera de trasplante reno-pancreático o que ya han sido trasplantados (reno-pancreático o renal aislado). Los controles se definieron como pacientes con DM1 con función renal preservada (filtrado glomerular estimado [FGe] > 90 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) y excreción urinaria de albúmina normal, apareados con los casos por sexo y tiempo de evolución de la diabetes (apareamiento por frecuencia). El tiempo de evolución de la DM1 se definió como los años entre el diagnóstico de la diabetes y la fecha en alcanzar un FGe < 15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> (en los casos) y entre el diagnóstico de la enfermedad y la fecha de entrada en la base de datos del Biobank (en los controles).

Los datos clínicos recogidos fueron: sexo, edad, edad al diagnóstico de la DM1 y duración de la DM1 hasta la entrada en

la base de datos del Biobank (controles) o hasta el trasplante o la terapia renal sustitutiva (casos). El genotipo de la Hp se realizó usando las muestras de ADN suministradas por el Biobank mediante reacción en cadena de la polimerasa siguiendo el protocolo de Koch et al.<sup>12</sup>.

El protocolo del estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético tanto del Hospital Clínic i Universitari de Barcelona como del Biobank. Se obtuvo el consentimiento informado de los sujetos del estudio.

El análisis estadístico se hizo mediante el paquete estadístico STATA.11. Los datos descriptivos se presentan como la media y la desviación estándar para las variables continuas, y como el número y el porcentaje para las variables categóricas. La prueba de la t-Student se usó para la comparación de variables continuas y la de  $\chi^2$  para las variables categóricas. Se construyeron modelos de regresión logística para estudiar la asociación entre el genotipo 2-2 de la Hp y la ND. El estudio del equilibrio de Hardy-Weinberg para el genotipo de la Hp se analizó con 1 grado de libertad. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Se incluyeron 114 pacientes en el estudio, 57 casos y 57 controles. No hubo diferencias estadísticamente significativas en el género (70 % frente a 61 % de varones,  $p = 1,0$ ) ni en la duración de la diabetes ( $23,0 \pm 6,7$  frente a  $20,8 \pm 9,3$  años,  $p = 0,1$ ). Sin embargo, los casos fueron mayores ( $44,9 \pm 8,6$  frente a  $40,9 \pm 9,5$  años;  $p = 0,02$ ) y la edad de debut de la diabetes menor ( $14,1 \pm 6,8$  frente a  $17,7 \pm 10,1$  años,  $p = 0,03$ ).

La distribución de los genotipos en nuestra muestra estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg. La prevalencia de genotipo de Hp 1-1, 2-1 y 2-2 fue de 19,3 %, 42,1 % y 38,6 % en casos, y de 17,5 %, 49,1 % y 33,4 % en controles, respectivamente. No hubo diferencias en la frecuencia de los diferentes genotipos ni en la de los diferentes alelos entre casos y controles (tabla 1). El estudio de regresión logística, incluyendo el sexo y el tiempo de evolución de la DM1 como covariables en el modelo, no mostró una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo 2-2 de la Hp y el desarrollo de ND (*odds ratio* 1,14, intervalo de confianza 0,52-2,52).

## DISCUSIÓN

En este estudio de casos y controles en población española, no hemos encontrado una asociación entre el genotipo de la Hp y la presencia de ND en pacientes con DM1, a pesar de una cuidadosa selección de estos, representando los extremos del espectro de la ND con el mismo tiempo de evolución de la diabetes.

**Tabla 1.** Genotipo de la haptoglobina y frecuencias de los alelos en la población del estudio

Genotipo	Casos (n = 57)	Controles (n = 57)	p
Genotipo 1-1 (n, %)	11 (19,3)	10 (17,5)	0,8
Genotipo 1-2 (n, %)	24 (42,1)	28 (49,1)	
Genotipo 2-2 (n, %)	22 (38,6)	19 (33,4)	
<b>Alelo</b>			
Alelo 1 (%)	40,35	42,11	0,8
Alelo 2 (%)	59,65	57,89	0,8

Datos expresados como porcentajes.

La contribución del genotipo de la Hp en el riesgo de ECV ha sido analizada en varios estudios longitudinales, relacionando el genotipo 2-2 con un incremento del riesgo de ECV en pacientes con DM1 y DM2<sup>4-7</sup>. Esta asociación puede tener algunas implicaciones en el manejo de los pacientes con diabetes, puesto que la suplementación con vitamina E ha demostrado disminuir los eventos cardiovasculares<sup>13,14</sup>, mayoritariamente en aquellos con DM2.

Con respecto a las complicaciones microvasculares de la diabetes, esta asociación es menos consistente. De hecho, la relación entre el genotipo de la Hp y el riesgo de retinopatía diabética ha sido poco estudiada, y con resultados contradictorios hasta ahora<sup>15,16</sup>.

Algunos trabajos han estudiado la asociación entre el genotipo de la Hp y el riesgo de ND, pero solo cuatro incluían a pacientes con DM1<sup>8-11</sup>. El primer estudio<sup>8</sup>, que incluía a pacientes tanto con DM1 como con DM2, mostró un incremento significativo del genotipo 2-2 en pacientes con micro y macroalbuminuria respecto a los otros genotipos. El segundo estudio (de casos y controles)<sup>9</sup> incluyó a 509 pacientes irlandeses con DM1, definiendo la ND como la presencia de una proteinuria mayor de 0,5 g/24 h. Este trabajo no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres genotipos, aunque halló una frecuencia mayor de alelo 2 de la Hp en los casos. El tercer estudio<sup>10</sup> incluyó a 95 pacientes con DM1 y 170 con DM2, sin encontrar asociación entre el genotipo de Hp y la presencia de ND (definida como la presencia de micro o macroalbuminuria). El último<sup>11</sup>, y el único prospectivo, incluyó a 486 pacientes con DM1, con un seguimiento medio de 18 años. No se halló relación entre genotipo de Hp y riesgo de ND en modelos univariantes, aunque en modelos multivariantes se encontró un riesgo casi dos veces mayor de descenso en el FGe y de enfermedad renal crónica con el genotipo 2-2 de la Hp.

En vista de las diferentes definiciones usadas de la ND en los distintos estudios, decidimos realizar el estudio genético en pacientes sin ningún indicio de ND (controles) y compararlo con aquellos con la forma más grave de ND (casos), con la misma evolución de la DM1. La frecuencia de los

diferentes genotipos de Hp fue muy similar a la de estudios previos que han analizado la frecuencia de genotipos de la Hp en población española<sup>17</sup>. Sin embargo, no hemos hallado relación entre el genotipo 2-2 y una mayor frecuencia de ND (38,6 % en casos y 33,4 % en controles;  $p = 0,8$ ) ni un efecto protector del genotipo 1-1 (19,3 % en casos y 17,5 % en controles;  $p = 0,8$ ).

Nuestro estudio no está exento de limitaciones. Puesto que los casos tenían unos criterios de selección muy restrictivos, nuestra muestra de pacientes con DM1 es limitada. Además, no disponemos de información longitudinal sobre el control metabólico ni de otros factores de confusión que pueden influenciar la evolución de la ND, como el tabaquismo o la hipertensión.

En conclusión, en nuestra muestra de pacientes con DM1 españoles, el genotipo de la Hp no parece tener una implicación en el riesgo de ND. En vista de nuestros resultados y de los resultados contradictorios de otros trabajos, se necesitan más estudios, con una muestra más amplia y de carácter prospectivo, para clarificar el papel de la Hp en el riesgo de complicaciones microvasculares en la DM1.

## Agradecimientos

Agradecemos a Biobank del IDIBAPS y CIBERDEM por las muestras y por la ayuda técnica aportadas.

## Conflictos de interés

Los autores declaran que no tienen conflictos de interés potenciales relacionados con los contenidos de este artículo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Melamed-Frank M, Lache O, Enav BI, Szafrank T, Levy NS, Ricklis RM, et al. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood* 2001;98(13):3693-8.

2. Wobeto VPA, Zaccariotto TR, Sonati MF. Polymorphism of human haptoglobin and its clinical importance. *Genet Mol Biology* 2008;31(3):602-20.
3. Costacou T, Levy AP. Haptoglobin genotype and its role in diabetic cardiovascular disease. *J Cardiovasc Transl Res* 2012;5(4):423-35.
4. Levy AP, Hochberg I, Jablonski K, Resnick HE, Lee ET, Best L, et al. Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: The Strong Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 2002;40(11):1984-90.
5. Roguin A, Koch W, Kastrati A, Aronson D, Schomig A, Levy AP. Haptoglobin genotype is predictive of major adverse cardiac events in the 1-year period after percutaneous transluminal coronary angioplasty in individuals with diabetes. *Diabetes Care* 2003;26(9):2628-31.
6. Suleiman M, Aronson D, Asleh R, Kapeliovich MR, Roguin A, Meisel SR, et al. Haptoglobin polymorphism predicts 30-day mortality and heart failure in patients with diabetes and acute myocardial infarction. *Diabetes* 2005;54(9):2802-6.
7. Costacou T, Ferrell RE, Orchard TJ. Haptoglobin genotype: a determinant of cardiovascular complication risk in type 1 diabetes. *Diabetes* 2008;57(6):1702-6.
8. Nakhoul FM, Zoabi R, Kanter Y, Zoabi M, Skorecki K, Hochberg I, et al. Haptoglobin phenotype and diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2001;44(5):602-4.
9. Conway BR, Savage DA, Brady HR, Maxwell AP. Association between haptoglobin gene variants and diabetic nephropathy: haptoglobin polymorphism in nephropathy susceptibility. *Nephron Exp Nephrol* 2007;105(3):e75-9.
10. Wobeto VPA, Garcia PMD, Zaccariotto TR, Sonati MF. Haptoglobin polymorphism and diabetic nephropathy in Brazilian diabetic patients. *Ann Hum Biol* 2009;36(4):437-41.
11. Costacou T, Ferrell RE, Ellis D, Orchard TJ. Haptoglobin genotype and renal function decline in type 1 diabetes. *Diabetes* 2009;58(12):2904-9.
12. Koch W, Latz W, Eichinger M, Roguin A, Levy AP, Schömig A, et al. Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR. *Clin Chem* 2002;48(9):1377-82.
13. Levy AP, Gerstein HC, Miller-Lotan R, Ratner R, McQueen M, Lonn E, et al. The effect of vitamin E supplementation on cardiovascular risk in diabetic individuals with different haptoglobin phenotypes. *Diabetes Care* 2004;27(11):2767.
14. Milman U, Blum S, Shapira C, Aronson D, Miller-Lotan R, Anbinder Y, et al. Vitamin E supplementation reduces cardiovascular events in a subgroup of middle-aged individuals with both type 2 diabetes mellitus and the haptoglobin 2-2 genotype: a prospective double-blinded clinical trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(2):341-7.
15. Nakhoul FM, Marsh S, Hochberg I, Leibu R, Miller BP, Levy AP. Haptoglobin genotype as a risk factor for diabetic retinopathy. *JAMA* 2000;284(10):1244-5.
16. Wobeto VPA, Rosim ET, Melo MB, Calliari LEP, Sonati MF. Haptoglobin polymorphism and diabetic retinopathy in Brazilian patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77(3):385-8.
17. Moral P, Panadero AM. Haptoglobin subtypes in Barcelona (Spain). *Hum Hered* 1983;33(3):192-4.