

NILMA ALMEIDA DE ASSIS

**Avaliação clínico-laboratorial e estudo da associação entre dois
polimorfismos na região promotora do gene VEGF em pacientes
diabéticos tipo 1 com e sem retinopatia diabética proliferativa**

CAMPINAS

2006

NILMA ALMEIDA DE ASSIS

**Avaliação clínico-laboratorial e estudo da associação entre dois
polimorfismos na região promotora do gene VEGF em pacientes
diabéticos tipo 1 com e sem retinopatia diabética proliferativa**

*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 Genética Médica.*

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner

CAMPINAS

2006

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

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

As76a Assis, Nilma Almeida de
Avaliação clínico-laboratorial e estudo da associação entre dois polimorfismos na região promotora do gene VEGF em pacientes diabéticos tipo 1 com e sem retinopatia diabética proliferativa / Nilma Almeida de Assis. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Carlos Eduardo Steiner
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Diabetes Mellitus Tipo 1. 2. Retinopatia diabética. 3. Polimorfismo (Genética). I. Steiner, Carlos Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Diabetes Mellitus type 1, proliferative diabetic retinopathy, vascular endothelial growth factor, single nucleotide polymorphisms

Keywords: • Diabetes Mellitus type 1
• Diabetic retinopathy
• Polymorphisms (Genetic)

Área de concentração : Genética Médica

Titulação: Mestrado em Ciências Médicas

Banca examinadora: Prof Dr Carlos Eduardo Steiner

Profa. Dra. Elizabeth João Pavin

Profa. Dra. Lucia Marques Alves Vianna

Data da defesa: 31-08-2006

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Carlos Eduardo Steiner

Membros:

1. Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner

2. Profa. Dra. Elizabeth João Pavin

3. Profa. Dra. Lucia Marques Alves Vianna

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

Data: 31/08/2006

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àqueles que, mesmo gozando de saúde perfeita, são altruístas e participam de ensaios como este, a fim de mitigar o sofrimento alheio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Ademir e Odilma, avó Oswaldina e irmãos Nilo e Diego (*in Memoriam*) pelo apoio incondicional e ao meu amor Andreas pelo carinho, compreensão e paciência; aos pacientes pelas esperanças depositadas.

Agradeço ao meu orientador que apesar da juventude soube associar a responsabilidade acadêmica à paciência, virtude tão rara entre os jovens.

Agradeço à bióloga Marilza Santos Silva e à equipe de colegas do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp pelo companheirismo e auxílio nos momentos de difíceis.

Agradeço aos Professores do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e em especial à Profa. Dra Iscia T. Lopes Cendes.

Agradeço à Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo.

Agradeço aos Funcionários da Administração do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp em especial à Cláudia, Sônia, Teresa Furlan, Márcia e Teresa Ferreira.

Aos colegas médicos Dra. Bianca Kneipp, Dr. José Paulo, Dr Osias, Dra. Rosana C. Bichara, Dr. Ricardo Meirelles, Dra. Virgínia Pinhal.

Agradeço à Profa.Dra. Hildete Prisco Soares e ao estatístico Rafael Pimenta Maia.

Agradeço ao Instituto Estadual de Endocrinologia Luiz Capriglione e à Santa Casa de São Paulo.

Agradeço à CAPES como órgão governamental financiador deste trabalho.

“AINDA que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

I CORÍNTIOS 13. 1-2.

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xxvii</i>
ABSTRACT.....	<i>xxxi</i>
1- INTRODUÇÃO.....	35
1.1- Classificação do Diabetes Melito.....	38
1.2- Diagnóstico.....	42
1.3- Diabetes Melito no Brasil.....	42
1.4- Etiologia do Diabetes Melito: Aspectos Ambientais e Genéticos.....	44
1.5- Etiologia do Diabetes Melito tipo 1.....	46
1.6- Retinopatia Diabética.....	49
1.7- Fisiopatologia da Retinopatia Diabética.....	52
1.7.1- Desenvolvimento Embrionário da Retina.....	52
1.7.2- Fisiopatologia dos danos vasculares.....	53
1.7.3- Fatores implicados na gênese dos danos vasculares.....	54
1.7.3.1- Via dos polióis.....	54
1.7.3.2- Produtos finais de glicação avançada.....	54
1.7.3.3- Eritropoetina.....	55
1.7.3.4- Estresse Oxidativo.....	56
1.7.3.5- Sistema Renina-angiotensina.....	56
1.7.3.6- Proteína quinase C.....	57
1.7.3.7- Perda dos Pericitos.....	57
1.7.3.8- Óxido nítrico.....	58

1.7.3.9- Inflamação.....	58
1.8- VEGF.....	59
2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	61
3- PACIENTES E MÉTODOS.....	65
3.1- Convocação/extração de DNA genômico.....	67
3.2- Avaliação Clínica.....	68
3.3- Análise Molecular.....	68
3.3.1- PCR.....	69
3.3.2- Digestão enzimática.....	70
3.3.3- Aplicação dos métodos.....	70
4- RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
4.1- Variáveis contínuas clínicas.....	77
4.2- Variáveis discretas clínicas.....	80
4.3- Estudos moleculares.....	82
4.4- Lei de Hardy-Weinberg.....	84
5- DISCUSSÃO.....	87
6- CONCLUSÕES.....	97
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
8- ANEXOS.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ALDR	<i>Aldehyde reductase (Aldose reductase)</i>
CEPH	<i>Centre d'Etude du Polymorphisme Human</i>
CMH	Complexo Maior de Histocompatibilidade
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
DM	Diabetes Melito
DM1	Diabetes Melito tipo1
DM2	Diabetes Melito tipo 2
DMG	Diabetes Melito Gestacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EP	Erro padrão
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
GAD	<i>Glutamic Acid Decarboxylase</i>
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HNF-1α	<i>Hepatic nuclear factor 1-α</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEDE	Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia
IL-1	Interleucina 1

IMC	Índice de Massa Corpórea
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
MODY	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i>
NAD⁺	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	Forma reduzida do NAD
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Oddis Ratio</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
RD	Retinopatia Diabética
RDP	Retinopatia Diabética Proliferativa
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WESDR	<i>Wisconsin Epidemiological Study of Diabetic Retinopathy</i>

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Percentual de diabéticos na população brasileira.....	43
Tabela 2- Número de diabéticos na população brasileira.....	43
Tabela 3- Par de Primers para PCR /Deleção.....	70
Tabela 4- Reagentes utilizados por amostra em PCR/deleção.....	71
Tabela 5- Par de Primers para PCR /-460.....	72
Tabela 6- Reagentes utilizados por amostra em PCR para análise de -460.....	72
Tabela 7- Reagentes utilizados por amostra em digestão para análise de -460.	73
Tabela 8- Média das variáveis contínuas segundo ausência e presença de retinopatia.....	78
Tabela 9- Níveis séricos de triglicerídeos e hemoglobina glicosilada em mulheres e homens.....	78
Tabela 10- Resultado dos Testes t comparando as médias entre os grupos.....	79
Tabela 11- Teste de bondade de ajuste para o modelo logístico.....	79
Tabela 12- Percentual de RDP por sexo.....	80
Tabela 13- Freqüências relativas: RPD x Origem.....	80
Tabela 14- Freqüências relativas: Retinopatia x população.....	81
Tabela 15- Freqüências relativas: Retinopatia x nefropatia.....	81
Tabela 16- Freqüências relativas: nefropatia X sexo.....	81
Tabela 17- Resultados dos testes Qui-quadrados para as Tabelas de 10 a 14...	82
Tabela 18- Modelo Logístico para a presença ou ausência de retinopatia.....	82
Tabela 19- Freqüências relativas: Retinopatia x – 460.....	84

Tabela 20-	Resultados dos testes Qui-quadrados para o polimorfismo -460.....	84
Tabela 21-	Valores observados de cada classe do -460 e os esperados segundo a Lei de Hardy-Weinberg.....	85
Tabela 22-	Frequências alélicas observadas no SNP rs833061.....	85
Tabela 23-	Valor P entre o presente estudo, CEPH e Lammer.....	86

LISTA DE FIGURAS

	<i>PÁG.</i>
Figura 1- Eletroforese do Produto da PCR.....	71
Figura 2- Eletroforese em gel de agarose.....	73
Figura 3- Digestão total.....	74
Figura 4- Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	83
Figura 5- Digestão enzimática.....	83

RESUMO

A retinopatia diabética é uma complicação freqüente no diabetes melito tipo 1, acometendo quase a totalidade de pacientes, em graus variados, após 20 anos de doença. A interferência de fatores ambientais como a manutenção de um estado hiperglicêmico na sua fisiopatologia já foi comprovada, mas ainda não foi esclarecido porque alguns pacientes desenvolvem essa complicação de maneira grave e precoce. Nos últimos anos, diversos estudos têm sugerido a participação de fatores genéticos nesse processo. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), potente indutor da angiogênese, foi associado à retinopatia diabética por alguns autores, pelo aumento da sua expressão, em virtude de mutações em sua região promotora. Neste trabalho foi realizada uma avaliação clínico-laboratorial, a análise do SNP rs833061 (- 460) e a pesquisa da deleção de 18 pares de bases em -2549, ambas na região promotora do gene *VEGF* em 114 pacientes com diabetes melito tipo 1, de três centros de referência em diabetes no Brasil – Hospital das Clínicas da Unicamp, Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia Luiz Capriglione (RJ) e Santa Casa da Misericórdia de São Paulo (SP). Houve associação entre retinopatia diabética proliferativa e nefropatia, porém nenhum paciente apresentou a deleção em -2549, nem o alelo -460 C em homozigose. Tais resultados sugerem que esses polimorfismos na região promotora do gene *VEGF* não interferem na predisposição à retinopatia diabética na população estudada e que outros agentes ambientais e/ou genéticos devem ser significativos.

Palavras-chave: Diabetes Melito tipo 1, Retinopatia diabética proliferativa, fator de crescimento endotelial vascular, polimorfismo de nucleotídeo simples.

ABSTRACT

Diabetic retinopathy is a frequent complication of diabetes mellitus type 1 and almost all patients develop it after twenty years of disease. The causes of these complications are not clear, but several environmental factors such as chronic hyperglycaemia may act in this predisposition, however, it is not clearly understood why some individuals develop it in a severe and precocious way. The participation of genetic factors as the vascular endothelial growth factor (VEGF), a potent angiogenic mediator, was already confirmed for some authors. In this study we investigate whether polymorphisms in *VEGF* gene are associated with proliferative diabetic retinopathy. One hundred-fourteen patients with diabetes mellitus type 1 underwent a clinical and laboratorial study, as well as the analysis of two polymorphisms: rs833061 and the deletion of 18 bp at -2549 both on the promoter region of the *VEGF* gene. There was an association between nephropathy and retinopathy in our patients but none of the individuals presented the deletion at -2549 or the allele C in rs833061 in homozygous state. These results suggest that such polymorphisms in the promoter region of the *VEGF* gene do not interfere in the predisposition to diabetic retinopathy in our population and that other environmental and/or genetic factor may be more relevant.

Key words: Diabetes mellitus type 1, proliferative diabetic retinopathy, vascular endothelial growth factor, single nucleotide polymorphisms.

1- INTRODUÇÃO

O termo Diabetes Melito (DM) designa um grupo de doenças caracterizado por hiperglicemia crônica que pode ser decorrente tanto da deficiência na produção de insulina pelas células β das ilhotas de Langerhans quanto do comprometimento da atuação da insulina em tecidos alvo, ou de ambos. A manutenção do estado hiperglicêmico tem sido associada em longo prazo a nefropatia, que pode evoluir para insuficiência renal, a neuropatia periférica, podendo haver úlceras de perna, amputações e articulações de Charcot, neuropatia autonômica, com conseqüentes sintomas cardiovasculares, genitourinários e gastrointestinais, a retinopatia, ao comprometimento do sistema cardiovascular (incidência aumentada de aterosclerose cardiovascular e periférica, além de doença cerebrovascular) e a disfunção sexual ^{88,89}.

Segundo a Associação Americana de Diabetes (ADA), esse grupo de doenças representa a quinta causa de mortes por doenças nos Estados Unidos. No ano de 2002, naquele país, os gastos com DM foram estimados em U\$132.000.000.000 (cento e trinta e dois bilhões de dólares), sendo que os gastos médicos totalizaram U\$91.800.000.000 (noventa e um bilhões e oitocentos milhões de dólares) ⁵.

Os sintomas e sinais mais freqüentemente associados à hiperglicemia são poliúria, perda de peso, polidipsia, algumas vezes polifagia e visão turva. Pode existir, também, maior susceptibilidade a algumas infecções específicas e déficit de crescimento. O coma hiperosmolar e a cetoacidose são as causas agudas de risco de vida associadas ao DM ⁸⁹.

A glicosilação de proteínas tissulares e outras macromoléculas, assim como o excesso na produção de polióis a partir da glicose, podem estar relacionados ao dano tecidual por hiperglicemia crônica. Hipertensão, anormalidades no metabolismo das lipoproteínas e doença periodontal são freqüentemente encontradas em pessoas com diabetes ⁸⁹.

Assim sendo, pelo grande comprometimento da qualidade de vida dos pacientes, assim como de seus familiares e de toda a sociedade, o DM constitui uma importante questão de Saúde Pública.

1.1- Classificação do Diabetes Melito

Entre 1979 e 1997, a classificação do DM considerava principalmente os aspectos farmacológicos do tratamento da doença. O avanço das pesquisas clínico-laboratoriais permitiu um melhor conhecimento fisiopatológico dos diferentes processos que levam ao distúrbio e que mantêm o estado de hiperglicemia justificando a necessidade de um novo agrupamento dos pacientes.

Considerando a grande heterogeneidade das suas manifestações clínico-laboratoriais, assim como variações em sua prevalência conforme diferenças étnico-raciais, evidências de susceptibilidade genética e complexos processos relacionados à imunidade, esse grupo de doenças foi novamente subdividido, surgindo, assim, em 1997, uma nova classificação para os vários tipos de DM ⁴. Esta, diferente da classificação anterior, tem como principal característica o fato de não ser norteadada pela necessidade ou não de insulinoaterapia, baseando-se, sim na etiopatogenia da doença e não no seu tratamento. Tal classificação é utilizada até os dias de hoje inclusive pela Organização Mundial de Saúde ²⁹ e pela Sociedade Brasileira de Diabetes ⁸².

Foram definidos, portanto, quatro grandes subgrupos de DM, a saber:

- I - Diabetes Melito tipo 1

Compreende a grande maioria dos casos em que há uma destruição primária das células β das ilhotas pancreáticas, com predisposição a cetoacidose. Essa destruição tem sido atribuída a processos auto-imunes, mas há casos em que a etiopatogenia permanece desconhecida (diabetes melito tipo 1 idiopática). Não estão incluídos nesse grupo os processos que causam dano às células pancreáticas por mecanismos não-imunes, como, por exemplo, a fibrose cística.

- II - Diabetes Melito tipo 2

Esse grupo compreende a grande maioria dos casos de DM e decorre da resistência à ação da insulina, com um defeito em sua produção.

▪ III - Outros tipos de Diabetes Melito, que subdividem-se em oito subtipos específicos:

A. Defeitos genéticos do funcionamento das células β

- HNF-1 α (forma MODY 3)
- Glicoquinase (forma MODY2).
- HNF-4 α (forma MODY 1)
- DNA mitocondrial
- Outros

B. Defeitos genéticos da ação da insulina

- Resistência à insulina tipo A
- Leprechaunismo
- Síndrome de Rabson-Mendenhall
- Diabetes Lipoatrófica
- Outros

C. Doenças do pâncreas exócrino

- Pancreatites
- Trauma/pancreatectomia
- Neoplasia
- Fibrose cística
- Hemocromatose
- Pancreatopatia fibrocalculosa
- Outros

D. Endocrinopatias

- Acromegalia
- Síndrome de Cushing
- Glucagonoma
- Feocromocitoma
- Hipertireoidismo
- Somatostatinoma
- Aldosteronoma
- Outros

E. Induzida por drogas e produtos químicos

- Vacor
- Pentamidina
- Ácido nicotínico
- Glicocorticóides
- Hormônio tireoidiano
- Diazóxido
- Agonistas β -adrenérgicos
- Tiazídicos
- Dilantina
- α -interferon
- Outros

F. Infecciosas

- Rubéola Congênita
- Citomegalovírus
- Outros

G. Formas incomuns de DM imunologicamente mediadas

- Síndrome “Stiff-man”
- Anticorpos anti-receptor de insulina
- Outros

H. Outras síndromes genéticas associadas ao DM

- Síndrome de Down
- Síndrome de Klinefelter
- Síndrome de Turner
- Síndrome de Wolfram
- Coreia de Huntington
- Síndrome de Bardet-Biedl
- Distrofia miotônica
- Porfíria
- Síndrome de Prader-Willi
- Outros

▪ IV - Diabetes Melito Gestacional (DMG)

A grande maioria dos casos abrange um dos dois primeiros grupos. O primeiro grupo, menos prevalente, é caracterizado pela deficiência absoluta da produção de insulina e pela presença, na maioria dos casos, de marcadores genéticos e sorológicos relacionados à

imunidade e agressão às células β das ilhotas pancreáticas. No segundo grupo, ocorre uma associação entre a resistência à ação deste hormônio e um mecanismo compensatória com produção aumentada de insulina, numa primeira fase, seguida de deficiência ou diminuição da insulino-secreção ⁴.

1.2- Diagnóstico do Diabetes Melito

Os critérios diagnósticos para o DM estão descritos abaixo ^{4,29,82}.

- Sintomas de diabetes (poliúria, polidipsia e perda de peso inexplicada) somados a concentração plasmática de glicose superior ou igual a 200 mg/dl (11,1 mmol/l) aferida a qualquer hora do dia sem restrições quanto ao horário da última refeição.
- Glicemia plasmática em jejum maior ou igual a 126 mg/dl (7,0 mmol/l). O jejum é definido como ausência de ingestão calórica por, no mínimo, oito horas.
- Glicemia plasmática maior ou igual a 200 mg/dl após duas horas da ingestão de glicose ministrada conforme o sugerido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), utilizando uma dose de glicose contendo o equivalente a 75 g de glicose anidra dissolvida em água.

Na ausência de hiperglicemia inequívoca com descompensação metabólica, esses testes devem ser repetidos mais uma vez em dias diferentes para confirmação diagnóstica ^{4,29,82}.

1.3- Diabetes Melito no Brasil

O último senso brasileiro de diabetes foi realizado em 1988 e identificou uma prevalência de 0,1% na população com idade até 29 anos, 7,65% na população entre 30 e 69 anos e 20% na população acima de 69 anos de idade (tabela1).

Tabela 1- Percentual de diabéticos na população brasileira.

DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA DA POPULAÇÃO-CENSO NACIONAL 2000 – IBGE ¹¹³ - PREVALÊNCIA DO DIABETES - CENSO NACIONAL DE DIABETES 1988.		
FAIXA ETÁRIA	PERCENTUAL DA POPULAÇÃO	PREVALÊNCIA DO DIABETES ^(*)
ABAIXO DOS 30 ANOS ^(*)	58%	0,1%
ENTRE 30 E 69 ANOS	38%	7,6%
ACIMA DE 69 ANOS	4%	20%

^(*) Diabéticos auto-referidos durante a realização do Censo de Diabetes de 1988.

Mais recentemente, um estudo conduzido em Ribeirão Preto, SP, no ano 2000, mostrou uma prevalência de diabetes de 12% na população entre 30 e 69 anos ⁹¹, sugerindo um importante aumento da incidência desse distúrbio na população brasileira em pouco mais que uma década.

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), com base no censo de 1988, é possível estimar o número de diabéticos na população brasileira utilizando a seguinte matriz (tabela 2):

Tabela 2- Número de diabéticos na população brasileira

TOTAL DE HABITANTES 186.633.690* ¹¹⁴				
DISTRIBUIÇÃO POR FAIXA ETÁRIA			PREVALÊNCIA DO DIABETES	
FAIXA ETÁRIA	I) Multiplicar (N) por:	II) População na faixa etária:	III) Multiplicar (II) por**:	IV) Número de diabéticos
< 30 ANOS	0,58	108.247.540	0,001	108.247
30-69 ANOS	0,38	70.920.802	0,076	5.389.981
> 69 ANOS	0,04	746.535	0,20	149.307
NÚMERO TOTAL DE DIABÉTICOS NO BRASIL				5.647.535

*Fonte : <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em 07/07/2006

** Números baseados na prevalências do Censo de Diabetes de 1988. Fonte: Proposta Básica para a Assistência ao Paciente Diabético no Município – Pimazoni Neto A. et al. Sociedade Brasileira de Diabetes e Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Edição 1999.

1.4- Etiologia do Diabetes Melito: Aspectos Ambientais e Genéticos

Desde a primeira metade do século passado, esforços têm sido empregados com o objetivo de caracterizar o mecanismo de herança envolvido na etiologia do DM, aqui entendida no seu sentido mais amplo. É claro que, sem a disponibilidade de métodos moleculares de análise, a avaliação exclusivamente clínica não trazia resultados reprodutíveis em diversas populações e a inclusão de indivíduos com o subtipo MODY e doenças genéticas que cursam com hiperglicemia constituíam um viés das amostras. Em 1934, Lawrence e outros geneticistas contemporâneos atentaram para a difícil interpretação dos mecanismos de herança do DM baseados exclusivamente nas Leis de Mendel ⁶⁰.

Por volta de 1950, já era claro para muitos a existência de dois tipos de DM, distintos com base na época de início dos sintomas, obesidade, tendência a cetose e dependência de insulina, embora não houvessem sido estabelecidos fatores etiológicos geneticamente determinados ⁵⁹. A hipótese de uma herança autossômica recessiva era sugerida, porém com penetrância incompleta já que somente 1/5 dos pacientes com este genótipo desenvolviam a doença. Harris, em 1950, acreditava que o DM de início precoce e o DM de início tardio eram estados homozigotos e heterozigotos de um determinado locus ⁴².

Também os prováveis mecanismos de herança poligênica e herança multifatorial foram supostos anos mais tarde. Em meados da década de 70, foram publicados os primeiros indícios de que os genes do Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH) poderiam atuar em conjunto com outros genes em desequilíbrio de ligação ^{9,19,64}. Análise de ligação não paramétrica em humanos revelou cerca de 12 *loci* contribuindo para a etiologia do DM insulino-dependente. De longe, os mais importantes foram localizados na região do HLA na região cromossômica 6p21 e apresentam polimorfismos em sítios de ligação das moléculas de classe II a peptídeos. Outra associação significativa ocorre entre o DM insulino-dependente e uma variação no número e repetições *in tandem* no gene da insulina na região cromossômica 11p15. Há variações alélicas neste locus (classe I com cerca de 40 repetições, classe III com cerca de 150 repetições) que interferem na transcrição do gene, mas uma ligação direta entre essas variações e a predisposição ao DM ainda não foi bem estabelecida. Outros *loci* de

importância quantitativa menor são aqueles localizados em: 15q, 11q13, 6q25, 18q, 2q31, 6q27, 3q21-q25, 10cen, no cromossomo X o locus DXS1068, e o gene da glucoquinase no cromossomo 7³⁴.

Com relação à especificidade do HLA, os *loci* HLA A, B e C são indiretamente detectados em linfócitos, utilizando anti-soros específicos que acusam a presença dos antígenos codificados por eles. Esses *loci* seriam herdados em bloco, constituindo um haplótipo - haplótipo HLA A,C,B,D(-DR).

Nelson (1975) estudou a frequência de genes HLA em gêmeos idênticos diabéticos e demonstrou um aumento da frequência de HLA B8 e de HLA B15 nos dependentes de insulina e esta tendência foi mantida em gêmeos dizigóticos.⁶⁸ Não houve evidência significativa de heterogeneidade com relação a B8 e B15 em pares concordantes quando comparados a pares discordantes, mas nove (22%) pares concordantes tiveram dois antígenos com associação positiva ao DM insulino-dependente, enquanto somente cinco (10,2%) apresentaram este achado no grupo de gêmeos discordantes. Isto sugere que o HLA, tanto em concordantes como em gêmeos discordantes com DM insulino-dependentes, está relacionado à susceptibilidade genética em ambos os grupos. Ou seja, há um forte componente ambiental atuando para que o “segundo gêmeo” desenvolva a doença ou não.

O mecanismo de atuação desses genes seria através da resposta inapropriada ou anormal a estímulos externos, como, por exemplo, vírus pancreatotrópicos, também influenciada pela presença de genes com efeito protetor, por exemplo, HLA B7 que modulariam a resposta imune para tais agentes²⁰.

Foi observada a persistência de anticorpos contra células das ilhotas por Cudworth em um período de cinco anos, conforme a distribuição de alguns genótipos HLA B. Houve um aumento do risco relativo da persistência desses anticorpos em pacientes diabéticos positivos para as variantes HLA B8 e HLA B40, e naqueles com ambos os antígenos este risco relativo chegou a 7,25 ($p=0,008$)²⁰. Houve, também, aumento do risco relativo nas associações B8 e B15, B8 e B18 em pacientes com anticorpos persistentes, com risco relativo de 2,59 e 4,13 respectivamente, embora não tenha sido considerado significativo. Nesse estudo, todos os pacientes B15 positivos foram também B8 positivos.

Num estudo paralelo, com pacientes que tiveram o diagnóstico de DM confirmado há até cinco dias anteriores ao início do estudo, foram testadas amostras de soro, com anticorpos neutralizantes do vírus Coxackie B. Foi observado um aumento significativo dos títulos de anticorpos em pacientes ambos, B8 e B15 positivos, quando comparados ao pacientes somente B8 ou somente B15 positivos e, principalmente com aqueles somente B7 positivos. Há também índices sugestivos, porém não significativos, de que diferenças séricas desses anticorpos também estão presentes em pacientes com infecções por Coxackie B2, B3, e B4 em pacientes que são positivos para B8 e B15. Essas evidências não foram observadas em infecções por adenovírus, micoplasma pneumonie e parainfluenza¹⁹.

Não houve até hoje, evidência de um haplótipo particular de HLA associado à idade de início do DM. Ao menos 80% das células β devem ter sido destruídas ou inativadas para que haja deficiência de insulina. A destruição das células pode ser decorrente tanto de um efeito cumulativo quanto da exposição repetida a um determinado patógeno¹⁴.

1.5- Etiologia do Diabetes Melito tipo 1

A destruição das células β do pâncreas, tida como causa do DM1, aparenta ter evolução sub-clínica por alguns anos antes do início dos sintomas e vários mecanismos fisiopatológicos foram sugeridos, sendo que na maioria deles o processo de destruição é autoimune.

O início do processo autoimune poderia atuar em diferentes níveis, incluindo antígeno da célula β , processo de apresentação de antígeno e regulação da interação entre as células T e B.

A participação de fatores não genéticos na etiologia do DM1 foi sugerida, em 1972, por Tattersal e Pyke⁸⁷ que observaram uma concordância de 50% na frequência dessa doença em gêmeos monozigóticos. Estudos populacionais mostraram que algumas regiões específicas do HLA estavam associadas ao aumento ou à diminuição do risco de

desenvolver DM1. Além disso, esses estudos indicaram que há diferentes genes atuando em populações distintas, o que pode sugerir um modelo de herança poligênica. A região do gene da insulina, no cromossomo 11, também mostrou associação com esta doença. Cerca de 20 regiões cromossômicas diferentes, além daquelas do HLA e do gene da insulina, estariam também envolvidas nesse processo, porém com uma associação mais fraca ²¹.

O modelo proposto em 1988 por Mandrup-Pulsen sugere reações em cascata que combinariam vários mecanismos. Inicialmente haveria um dano da célula β por fatores ambientais levando a liberação e seqüestro de antígenos que, por sua vez, levaria a auto-agressão pelas células T por moléculas específicas do CMH. As moléculas envolvidas na perpetuação desse processo seriam a interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e outras citocinas. Uma vez iniciado o processo de destruição das células, este poderia ainda sofrer a interferência dos fatores ambientais que atuariam inicialmente aumentando a necessidade da produção de insulina e a produção de citocinas, levando a uma aceleração ou desaceleração do mesmo; haveria também mecanismos de reparo atuando neste processo. Sabe-se que há uma maior expressão do antígeno de superfície GAD 65 na superfície das células β em resposta ao aumento da secreção de insulina ⁶³.

Em contraposição aos fatores genéticos, fatores ambientais também foram apontados como agentes capazes de desencadear ou intensificar a destruição de células β . A análise desses fatores é particularmente difícil em virtude do extenso período entre o início do processo auto-imune e as manifestações clínicas que permitem o diagnóstico. Também parece provável que o estresse psicológico atue através do aumento das necessidades de insulina, com o excesso de cortisol e liberação de catecolaminas.

O agente ambiental cuja atuação está mais fortemente evidenciada é o vírus da rubéola levando a síndrome da rubéola congênita, mas não a infecção pós-natal. Rubenstein, em 1982, analisando os alelos HLA em pacientes com síndrome da rubéola congênita, observou uma alta frequência de alelos de alto risco em pacientes diabéticos ⁷⁵. Além disso, há uma maior prevalência de distúrbios autoimunes da tireóide em pacientes com aquela síndrome ¹⁶. Mesner et al. observaram um aumento na prevalência de DM em pacientes com complicações da síndrome da rubéola congênita ⁶⁵. Hyöty et al. Mostraram,

num estudo prospectivo na Escandinávia, um aumento dos níveis séricos de anticorpos IgM contra o vírus coxsackie B e contra enterovírus em títulos maiores que os da população geral, em gestantes cujos filhos posteriormente vieram a desenvolver diabetes ⁴⁴. Não foi comprovado por uma série de estudos que a vacinação contra rubéola interfira na gênese do DM1.

Foi observada relação entre o número total de infecções na infância durante o ano em que houve o início dos sintomas de DM1, sendo sugerido também que estas podem atuar positivamente no desenvolvimento da doença, o que ocorreria pelo aumento dos níveis de IL-1 e TNF- α ¹¹.

Em 1988, o *Diabetes Epidemiology Research International Group*, pesquisando se fatores geográficos poderiam interferir na incidência de DM1 em crianças, observou uma maior incidência na Escandinávia e uma menor incidência no Japão. Uma análise ecológica levou a uma relação inversa entre a incidência do DM1 e a temperatura média anual. Considerando que tal variação na incidência poderia ocorrer em virtude de variações genéticas, foi também analisada essa variação em um grupo homogêneo geneticamente, representado, então pela população sueca. Nessa análise um gradiente norte-sul foi encontrado. A mesma evidência foi observada através do log inverso linear entre a média mensal de temperatura e a incidência de DM1 ²². Estudos subsequentes também mostraram uma menor incidência em meses mais quentes. Talvez a temperatura interfira neste processo pelos altos níveis glicêmicos em jejum, levando a altos níveis de insulina, como ocorre em indivíduos saudáveis ³¹.

A alta velocidade de crescimento que ocorre na puberdade está relacionada à resistência periférica à insulina através da ação do hormônio do crescimento ¹¹. Um estudo realizado com 373 pacientes evidenciou que o maior pico de surgimento dos sintomas de DM1 é aos 11 anos e parece que há outros dois picos menores entre os cinco e sete anos e na terceira década ¹⁹.

Dahlquist (1998) sugere que os fatores ambientais, atuando de maneiras diferentes possam ser divididos em dois grupos: iniciadores e promotores (ou precipitadores/gatilhos). Seriam iniciadores infecções perinatais virais, incompatibilidade sanguínea Rh materno-fetal, proteínas do leite de vaca e nitrosaminas,

enquanto os gatilhos seriam infecções freqüentes, ambiente frio, alta velocidade de crescimento e estresse ²³.

1.6- Retinopatia Diabética

A retinopatia diabética é a causa mais comum de cegueira na população de adultos jovens nos países ocidentais industrializados ^{13,67}. Embora seja comum aos tipos 1 e 2, é muito mais freqüente no primeiro ¹⁴.

A prevalência dessa complicação está diretamente relacionada ao tempo de duração da doença e ao controle glicêmico. Após 20 anos de doença quase todos os pacientes com DM1 e cerca de 60% dos pacientes com DM2 têm algum grau de retinopatia ⁶

Um estudo realizado no sul da Alemanha entre 1990 e 1993 revelou que, naquela população, o risco de cegueira atribuído ao DM, entre expostos foi de 0,81 e na população geral foi de 0,14. O risco relativo diminuiu consideravelmente com o avanço da idade ⁹³.

Roy et al (2004) estimaram a prevalência de retinopatia diabética na população norte-americana acima de 18 anos de idade portadora de DM1 diagnosticada antes dos 30 anos em 74,9% e 82,3% em negros e brancos respectivamente, sendo que em 30% dos negros e em 32,2% dos brancos a retinopatia causava comprometimento visual. Eles comprovaram, então, que a retinopatia diabética constitui um problema de saúde pública, atingindo uma em cada 300 pessoas, considerando todos os seus níveis de gravidade e uma em cada 600 pessoas considerando o comprometimento da visão ⁷⁴.

Segundo o *Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy* (WEDR), 3,65% dos pacientes que tiveram o diagnóstico de DM antes dos 30 anos e 1,6% dos pacientes que tiveram o diagnóstico após esta idade eram legalmente cegos ¹. Dentre os

¹ São considerados legalmente cegos aqueles pacientes cuja acuidade visual, com a melhor correção óptica, no melhor olho, é igual ou inferior a 20/200 ou quando o campo visual é inferior a 20°.

pacientes cegos do primeiro grupo, 86% assim estavam pela retinopatia, o que ocorreu em 1/3 dos pacientes cegos do segundo grupo. Isto pode ser justificado pela presença de co-morbidades em pacientes cujo diagnóstico foi mais tardio ⁵³.

Klein et al (1996), após acompanhar 553 pacientes diabéticos ao longo de dez anos, constataram que a progressão para retinopatia diabética proliferativa foi de 29,8% ⁵². A OMS afirma que a prevalência desta complicação está entre 10 e 20% da população diabética sem considerar-se um tipo específico de diabetes nem o país de origem²⁹. Mas a análise de uma série de estudos epidemiológicos sobre retinopatia diabética e edema macular realizada por Williams et al concluiu que os métodos empregados nos mesmos são tão heterogêneos, o que leva à necessidade de um esforço maior objetivando uma melhor análise epidemiológica que possa ser utilizada futuramente em ensaios clínicos ¹⁰¹.

A redução da incidência de cegueira por retinopatia diabética em pelo menos 1/3 no prazo de cinco anos foi declarada como objetivo principal para o continente europeu, pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Federação Internacional de Diabetes (Declaração de São Vicente-1989) ³⁰.

A classificação da retinopatia diabética é feita conforme o estado dos vasos da retina. Na forma não proliferativa leve há alterações vasculares como microaneurismas e hemorragia, *cotton-wool spots* e aumento da permeabilidade vascular. Nas formas não proliferativa moderada e grave há intensificação da hemorragia e dos microaneurismas, anormalidade do calibre das veias, anormalidades vasculares intraretinianas e oclusão vascular. Na forma proliferativa há o crescimento de novos vasos sangüíneos na retina e na parte posterior do vítreo, além de proliferação de tecido fibroso ^{3,14}.

A perda da visão é decorrente de processos que sucedem a perda da visão central pelo edema macular ou pela não perfusão capilar. A partir daí, no caso da retinopatia diabética proliferativa (RDP), tanto os novos vasos, que podem sangrar e levar a hemorragia vítrea, como a contração dos tecidos fibrosos que os acompanham, podem distorcer a retina e levar à sua tração e descolamento com perda da visão, geralmente de forma irreversível ³².

A hiperglicemia crônica é considerada o principal determinante ambiental da retinopatia diabética. Um controle fino dos níveis glicêmicos resulta em uma diminuição significativa da progressão da retinopatia ^{52,88}. A hiperglicemia prolongada secundária a outras entidades clínicas como, por exemplo, a pancreatite, a hemocromatose e a acromegalia não são associadas a retinopatia, o que sugere a participação de mecanismos relacionados ao DM especificamente, atuando no surgimento e na sua evolução. O risco de desenvolver retinopatia diabética é também influenciado pela presença de glaucoma, miopia, doença oclusiva carotídea, com “efeito protetor” e puberdade, gravidez e hipertensão, com efeito adverso, ou seja, favorecendo o desenvolvimento e a progressão da retinopatia ².

A doença proliferativa é mais prevalente com o mesmo tempo de evolução no DM insulino que no DM não insulino-dependente ¹⁴. Além disso, a retinopatia proliferativa é vista de forma significativa com mais frequência em pacientes diabéticos com genótipo HLA-DR 4/0, 3/0, e X/X, que em pacientes controles diabéticos ⁷².

Foi observado que alguns pacientes com DM 1 têm um aumento da atividade fibrinolítica e baixos níveis de PAI-1 (potente inibidor da fibrinólise). Uma alta atividade sérica foi observada em pacientes com DM2 e está relacionada à doença microvascular em pacientes com DM tipo 2 e não diabéticos) com retinopatia diabética. Alguns estudos não observaram essa associação de forma significativa ³⁴. Num estudo realizado por Looker entre 1982 e 1990, foi observado que em índios Pima com DM2 a retinopatia não está relacionada à atividade do *PAI-1*, porém pacientes com genótipos 4G/4G e 4G/5G têm maior prevalência de retinopatia que o grupo com genótipo 5G/5G, o que sugeriu que o alelo 4G do gene *PAI-1* foi associado a um maior risco de retinopatia ⁶¹.

Em 1996, Agardh et al. compararam dois grupos de pacientes, um com DM de início precoce ou não e retinopatia proliferativa e outro grupo com sinais leves ou sem retinopatia. Foi realizada a genotipagem de alta resolução por PCR e por hibridização alelo específica. Observou-se que os alelos no haplótipo DR3-DQ2, DRB1*0301, DQA1*0501 e DQB1*0201 foram mais frequentes em pacientes com retinopatia grave. Uma diferença foi vista combinando certos alelos dos genótipos DQA1*03/0501 ($p<0,05$) e DQB1*0201/0302 ($p<0,01$). Esses achados sugerem que DQB1*0201/0302 é um forte

marcador genético para retinopatia grave e que DRB1*0301/0401 tem somente um papel secundário influenciando este processo quando combinado a esse genótipo. Parece que os pacientes com o genótipo DR3-DQ2/DR4-DQ8 (DRQB1*0301-DQA1*0501-QB1*0201/DRB1*0401 - DQA1*03-DQB1*0302) têm um risco maior de desenvolver retinopatia grave ¹.

Deve-se também levar em consideração outros fatores de risco para microangiopatia, tais como fumo e hipertensão nos estágios iniciais do DM1. Num estágio posterior são fatores de risco adicionais um inadequado controle glicêmico, hipertensão arterial e dislipidemia ⁴⁹.

1.7- Fisiopatologia da Retinopatia Diabética

1.7.1-Desenvolvimento Embrionário da Retina

As células ganglionares se formam antes das células visuais. A mácula surge por último. Quando é alcançado o estágio de recepção, o de transmissão já funciona. Isto decorre do fato de que muito precocemente, por volta da terceira semana de gestação, no folheto externo (ou epitélio pigmentar) o pigmento é formado. Ao mesmo tempo, o folheto interno ou retina visual segue seu desenvolvimento do pólo posterior para a periferia e das zonas mais internas para as zonas mais externas. A cúpula óptica será formada no primeiro mês gestacional pela evaginação da vesícula óptica primitiva. A parte anterior da cúpula seguirá para frente originando o corpo ciliar e a íris. Observa-se que nesse estágio, a retina é uma evaginação lateral cerebral, apresentando uma estrutura histológica semelhante àquela. Ela apresentara neste estágio três camadas (de fora para dentro): 1) Uma camada marginal à celular que posteriormente será colonizada pelas fibras ganglionares. 2) uma camada nuclear germinativa que ocupa 90% da sua espessura e origina todas as células da retina, e 3) uma camada fértil que constitui o neuroepitélio primitivo. ^{17,24}

Ao longo do segundo mês de gestação, entre a quinta e a sexta semanas, há o fechamento da fenda embrionária. O mesênquima que formará o vítreo e a artéria hialóide já é observado. A união dos folhetos ocorre na parte central e segue e progride para frente e

para trás, até o ponto de penetração da artéria hialóidea. Os núcleos mais internos da camada germinativa, única no primeiro mês, migram para a camada marginal anucleada e por volta da oitava semana surgem as camadas neuroblásticas interna e externa. A camada neuroblástica interna é a primeira a se diferenciar, com a constituição de células ganglionares, cujos axônios formarão o nervo óptico. A camada neuroblástica externa iniciará sua diferenciação a partir do terceiro mês. Durante o quarto mês efetua-se uma diferenciação mais avançada e ao final deste os cones e bastonetes já têm seu aspecto próximo do definitivo. É nesse período que ocorre a vascularização da retina. Uma rede vascular intra-vítrea pré-existente atrofia-se e ao nível da papila há uma dilatação da artéria hialóidea, que irá marcar o limite da artéria hialóidea caduca e, posteriormente, será a extremidade intra-ocular da artéria central da retina, a partir da qual surgirão novos vasos.^{17,24}

No nono mês gestacional a retina já está quase completamente formada e somente a região macular sofrerá modificações até o final do quarto mês pós-natal²⁴.

1.7.2- Fisiopatologia dos danos vasculares

As lesões da retinopatia diabética podem ser agrupadas conforme a gravidade e o tipo de lesão vascular. Atualmente considera-se retinopatia diabética leve, retinopatia diabética moderada, retinopatia diabética pré-proliferativa e retinopatia diabética proliferativa. Os achados macroscópicos principais observados via fundoscopia indireta são, na retinopatia diabética não proliferativa, vasodilatação, microaneurismas e hemorragias intra-retinianas, enquanto na retinopatia diabética proliferativa surgem neovascularização, que pode ocorrer no disco óptico, retina e/ou íris, vasodilatação, tração da retina e, às vezes, descolamento da retina^{14,46}

Histologicamente, a alteração inicial da retinopatia diabética é a perda dos pericitos¹⁸. Em condições normais, a relação entre pericitos e células endoteliais capilares é 1:1. Ao longo dos anos os pacientes diabéticos apresentam um desequilíbrio nessa relação, que pode chegar a até 1:10⁵⁸.

Observa-se, também, posteriormente, a formação de microaneurismas, o afinamento da membrana basal, o aumento da permeabilidade vascular e a oclusão vascular. No estágio mais avançado percebe-se, então, a formação de novos vasos ⁶².

1.7.3- Fatores implicados na gênese dos danos vasculares

1.7.3.1- Via dos Polióis

Entende-se como via dos polióis a redução de glicose em sorbitol e do sorbitol em frutose, respectivamente, através da ação das enzimas aldose redutase e sorbitol desidrogenase que utiliza o NAD^+ como co-fator ¹⁰⁶. Essa via é ativada sob condições de hiperglicemia e está fortemente implicada na fisiopatologia das complicações vasculares do DM, principalmente a neuropatia diabética ^{51,96}. Uma série de eventos decorrentes do desequilíbrio dessa via pode justificar danos celulares. Segundo a hipótese da pseudo-hipóxia ¹⁰², um aumento da atividade da enzima sorbitol desidrogenase produziria a um desequilíbrio da razão NADH/NAD levando a um conseqüente prejuízo do metabolismo lipídico e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Por sua vez, esse desequilíbrio resultaria em uma falha no controle do fluxo sanguíneo da retina ^{15,94}

1.7.3.2- Formação de produtos finais de glicação avançada

Uma reação enzimática entre cetonas e aldeídos e grupos amino de proteínas contribui para o comprometimento funcional destas e pode levar conseqüentemente aos danos vasculares estruturais observados nas complicações do diabetes ⁸⁴. Sob hiperglicemia, após alguns dias, os produtos iniciais de glicação sofrem reações e rearranjos ulteriores tornando-se irreversivelmente glicados, sendo chamados produtos finais de glicação.

A participação dos produtos finais de glicação aumenta a adesão leucocitária a células endoteliais *in vitro* favorecendo, então o processo inflamatório, através da indução intracelular da expressão da molécula de adesão 1 ⁶⁶. Os produtos finais de glicação atuam

também induzindo à agregação plaquetária e à estabilização da fibrina, facilitando a trombose vascular ^{104,111}. Nos pericitos há um acúmulo de produtos finais de glicação, cuja ação citotóxica foi confirmada *in vitro*. Eles induzem a um retardo no crescimento celular e à apoptose ^{79,109}, além de promover uma *up-regulation* do gene *VEGF* nas células endoteliais da retina ¹⁰⁴. Além disso, esses produtos finais de glicação também atuam aumentando a razão entre os níveis de angiopoetina 2 RNAm e angiopoetina 1 RNAm nas células endoteliais da retina. O dano vascular ocorreria porque, pela atuação da angiopoetina 2, há um recrutamento dos pericitos, fortalecendo a integridade vascular e, pela ação da angiopoetina 1, há perda do contato entre os pericitos e as células endoteliais ⁴⁸.

Porém, é importante lembrar que no diabetes há, de maneira sistêmica, um prejuízo da angiogênese, explícito, por exemplo, na difícil cicatrização de feridas desses pacientes. Sttit (2005) investigou a regulação angiogênica retiniana em soros de pacientes diabéticos e testou se os produtos finais de glicação avançada poderiam modular tal fenômeno, possivelmente através dos receptores desses produtos finais. Seus resultados sugeriram que houve uma supressão significativa da angiogênese vascular retiniana no diabetes e que, possivelmente, isso ocorreu através da interação entre produtos finais de glicação avançada e seus receptores ⁸⁵.

1.7.3.3- Eritropoetina

Além da função eritropoiética da eritropoetina, há indícios de que ela possua efeito neuroprotetor ³⁷ e angiogênico ⁴⁶. Até o momento, sabe-se que ela promove a proliferação e a diferenciação de precursores eritróides através da indução proteínas anti-apoptóticas e, segundo Jaquet el al., teria um potencial angiogênico semelhante ao do *VEGF* ⁴⁶.

A hipoxia decorrente da isquemia, fenômeno comum na retinopatia diabética, é um dos mais potentes estímulos para a expressão do gene da eritropoetina que ocorre em vários tecidos, inclusive na retina de mamíferos adultos, onde, inclusive, são expressos também seus receptores ³⁹.

Ao compararem concentrações vítreas de eritropoetina em pacientes com e sem retinopatia diabética, Katsura et al. encontraram uma concentração significativamente maior nos pacientes com retinopatia diabética proliferativa⁵⁰

Uma comparação entre concentrações vítreas de eritropoetina em 144 pacientes associada à análise do potencial proliferativo de acordo com o crescimento de células endoteliais *in vitro*, na presença de seu receptor, sugeriu que a eritropoetina seja um potente fator angiogênico induzido pela isquemia, atuando independentemente do VEGF durante a angiogênese da retina na retinopatia diabética proliferativa^{97,113}.

1.7.3.4- Estresse Oxidativo

Por uma série de mecanismos como a via dos polióis, a auto-oxidação da glicose, o aumento da produção de superóxidos pela mitocôndria¹⁰⁵, a ativação da proteína-quinase C e a formação de produtos terminais de glicação, há um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez alteram a expressão gênica de fatores de crescimento e citocinas, interferem nos processos inflamatórios e na ativação de macrófagos e plaquetas⁸³. O estresse oxidativo é uma intercessão de vários processos diferentes desencadeados pela hiperglicemia e pode justificar parcialmente os danos vasculares apresentados por pacientes diabéticos.

Polak et al, em 2004, mensuraram o estresse oxidativo através da análise da peroxidação lipídica com a dosagem da concentração plasmática de malondialdeído e 4-hidroxynonenal em pacientes diabéticos tipo 2 retinopatas e não retinopatas. Concentrações séricas desses produtos significativamente mais altas foram encontradas em pacientes diabéticos retinopatas⁷¹.

1.7.3.5- Sistema Renina-angiotensina

No diabetes há a atuação sistêmica e local da angiotensina⁸. Nos pericitos a angiotensina II atua diminuindo a síntese de DNA e estimula a *up-regulation* do gene *VEGF*, além de estimular a formação de espécies reativas de oxigênio.

1.7.3.6- Proteína quinase C

Trata-se de uma família de isoenzimas ativadas pelo diacilglicerol, que atua intimamente na expressão gênica de fatores de crescimento e citocinas. Sabe-se que a hiperglicemia induz um aumento da quantidade total de diacilglicerol na retina ⁸⁰. E um aumento do diacilglicerol foi observado em retina, glomérulo e aorta de pacientes diabéticos, o que poderia estimular excessivamente a atividade destas enzimas e, conseqüentemente, das citocinas e dos fatores de crescimento nesses tecidos ⁴⁵.

1.7.3.7- Perda dos Pericitos

Pericitos são células alongadas que se distribuem sobre as células endoteliais ao longo dos capilares. Inicialmente, em virtude dos filamentos contráteis localizados próximos a sua face em contato com as células endoteliais, acreditava-se tratar de células com características de músculo liso e que sua função principal era manter o tônus capilar ⁴³. Atualmente sabe-se que tais células não somente desempenham essa função, como também atuam na regulação do crescimento das células endoteliais, as protegem contra danos sofridos em virtude da peroxidação lipídica e interferem positivamente na sua capacidade de produzir prostaglandinas. Enfim, os pericitos atuam na manutenção da homeostase endotelial. Dessa forma, a perda dos pericitos pode interferir na trombogênese, injúria endotelial e indiretamente na angiogênese ¹¹⁰. As células endoteliais produzem endotelina-1 que atua como um importante mediador estimulando o crescimento celular dos pericitos ¹⁰⁷. Mas a responsividade dos pericitos à endotelina diminui sob condições de hiperglicemia, o que pode justificar parcialmente os danos vasculares causados pela hiperglicemia ²⁸. Por outro lado, a perda dos pericitos, principalmente sob condições de estresse metabólico como no diabetes, reduz a inibição da proliferação de células endoteliais, facilitando, então, a angiogênese ^{41,110}.

Há indícios, através de estudos em modelo animal, que o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) desempenhe um importante papel na manutenção dos pericitos. Ratos que não expressavam seu gene apresentaram morte neonatal precoce

decorrente de hemorragia, e mostraram uma perda difusa de pericitos. Naqueles em que houve *knockout* do fator de crescimento derivado de plaquetas específico para o endotélio foram observados vários fenótipos, sendo que, em muitos, havia áreas com interrupção da cobertura endotelial por estas células e houve coincidência entre áreas descobertas e áreas com retinopatia grave ¹².

1.7.3.8- Óxido nítrico

O óxido nítrico é um vasodilatador potente que modula o tônus vascular na retina e na coróide ⁵⁶. Há a expressão da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) em células endoteliais da retina humana. Ela apresenta três isoformas: eNOS, no endotélio vascular da retina e coróide; nNOS, em células amácrimas e fotorreceptoras e, iNOS nas células de Müller, pericitos e no epitélio pigmentar da retina ¹⁰⁰.

O *VEGF* também exerce sua influência através da ativação da enzima óxido nítrico sintetase pela auto-fosforilação do VEGFR-2 em células vasculares endoteliais que, por sua vez, estimulará a angiogênese e a permeabilidade vascular ⁵⁷.

1.7.3.9- Inflamação

Van Hecke et al. ⁹⁵, considerando a possibilidade da inflamação crônica e da disfunção vascular endotelial desempenharem um importante papel na fisiopatologia da retinopatia diabética, avaliaram sua associação num estudo em que a maioria dos indivíduos apresentava retinopatia não proliferativa. Foi percebido que a atividade inflamatória esteve associada à retinopatia tanto em pacientes com DM2, como em indivíduos não diabéticos. Já a disfunção vascular endotelial esteve associada a um risco cinco vezes maior de retinopatia em indivíduos não diabéticos. Estas associações foram independentes de outros fatores e risco para retinopatia ⁹⁵.

1.8- VEGF (fator de crescimento endotelial vascular)

O gene do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*) compreende uma família da qual fazem parte *VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, fator placentário de crescimento (*PlGF*) e o homólogo viral, *VEGF-E*. O mais importante do ponto de vista vascular-endotelial, estimulando a angiogênese e o aumento da permeabilidade endotelial, é o *VEGF-A*, que tem seu gene localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p12) ³⁵.

São conhecidos diferentes produtos desse gene devido ao *splicing* alternativo de seu RNAm: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ e sua ação ocorre através dos receptores VEGFR-1, VEGFR2 e VEGFR3, que são tirosino-quinases. Os componentes da família *VEGF* estão presentes nas células vasculares e neuro-gliais da retina. A expressão do *VEGF*, assim como do receptor *VEGFR-2*, foi observada em vasos sanguíneos, astrócitos, células de Müller, células ganglionares e epitélio pigmentar da retina. O VEGFR-1 foi identificado em pericitos. As atividades do receptor VEGFR1 ainda não estão claras, porém acredita-se que atue nos pericitos, nas células do músculo liso vascular e na migração de monócitos. A maioria das funções do *VEGF* nas células endoteliais deve-se ao receptor VEGFR-2. Os outros componentes da família *VEGF* têm funções distintas e relacionadas à progressão tumoral ⁴⁷, estando o *VEGF-B* envolvido na progressão tumoral não vascular e o *VEGF-C* e o *VEGF-D* na angiogênese e na linfangiogênese tumorais. Nesta análise será feita referência ao *VEGF-A*.

Como mencionado anteriormente, vários fatores ambientais exercem sua influência estimulando a expressão do gene *VEGF* como a hiperglicemia, a hipoxia, os produtos finais de glicação avançada, o fator de crescimento derivado de plaquetas, a angiotensina, o estresse oxidativo e hipóxia ⁷⁸. Outros fatores conhecidos também interferem na sua expressão como oncogenes, quelantes de ferro ³⁸, lipopolissacarídeos ⁹⁸ e hormônios ³⁵.

A hipóxia induz a um aumento na expressão do *VEGF*, o que é relevante em retinopatias isquêmicas como a diabética, a degeneração macular relacionada à idade e a retinopatia da prematuridade.

Também alguns polimorfismos na região promotora e no primeiro éxon do gene *VEGF-A* parecem ter influência na sua expressão ^{99,112}. Uma deleção de 18 pares de bases na região promotora do gene *VEGF-A* em -2549 quando combinada ao alelo Z+2 5`ALDR2 parece estar associada com a patogênese da nefropatia diabética ¹¹².

Os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), ou polimorfismos de nucleotídeos simples são mutações de ponto que se mantiveram no genoma. A densidade média estimada desses polimorfismos no genoma é de um a cada 2790 pares de bases (bp), mas sua distribuição não é uniforme ⁹⁰. Os SNPs podem formar ou não sítios de reconhecimento de endonucleases de restrição.

Na região promotora do gene *VEGF* a -460 bp existe um SNP referente à troca de uma citosina por uma timina. Nos bancos de dados NCBI (*National Center of Biotechnology Investigation*) e *Ensemble Genome Browser* é identificado por rs833061. ¹¹⁵. Esse SNP é um dos mais freqüentes desse gene. Watson et al. (2000), em 115 indivíduos saudáveis, registrou freqüências 0,526 e 0,474 para os alelos C e T respectivamente ⁹⁹. O *Ensemble Genome Browser* faz alusão a dois outros registros de freqüências alélicas para este polimorfismo, o primeiro deles em 92 indivíduos não aparentados de genealogias do Centre d'Etude du Polymorphisme Human (CEPH), sendo registradas as freqüências de 0,42 para o alelo selvagem C e 0,58 para o alelo T. O segundo abrangendo indivíduos negróides, caucasóides, hispânicos e asiáticos registrou as freqüências de 0,532 para o alelo selvagem C e 0,468 para o alelo T ¹¹⁵.

Por outro lado, Ray et al. (2004) mostraram que o alelo -460 C, forma selvagem do SNP rs833061, foi um fator preditivo independente para retinopatia diabética, mas que o SNP [rs2010963](#), tanto na forma de seu alelo selvagem G quanto a variante C, não parece exercer influência neste processo².

² O SNP [rs2010963](#) localiza-se a +405 bp no primeiro éxon do gene *VEGF-A* e é caracterizado pela variação C/G.

2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Tendo em vista o exposto e considerando que os trabalhos que demonstraram a associação entre os polimorfismos na região promotora do gene *VEGF* foram realizados em populações não latino-americanas e não havendo estudo semelhante na população brasileira, com a necessidade de uma melhor caracterização genético-molecular dos pacientes diabéticos brasileiros, esse trabalho tem como objetivo avaliar a repercussão dessas alterações em nosso meio. Objetiva-se, portanto:

- (1) comparar dados de avaliação clínico-laboratorial em indivíduos com DM1 com e sem retinopatia diabética proliferativa, acompanhados em serviços públicos de referência em três grandes cidades brasileiras.
- (2) pesquisar a associação entre uma deleção de 18 pares de bases localizada a -2549 na região promotora do gene *VEGF-A*, em pacientes com e sem retinopatia diabética proliferativa, e testar sua associação a essa complicação.
- (3) identificar o polimorfismo rs833061 localizado na região promotora do gene *VEGF-A* em pacientes com e sem retinopatia diabética proliferativa e testar sua associação a essa complicação.

3- PACIENTES E MÉTODOS

3.1- Convocação/extração de DNA genômico

Foram convidados a participar deste estudo pacientes com DM1 e diagnóstico estabelecido há, no mínimo, 10 anos, acometidos ou não por retinopatia diabética em qualquer estágio de gravidade, oriundos do ambulatório de Endocrinologia – DM1 do Hospital das Clínicas da Unicamp, em Campinas, do ambulatório de Endocrinologia do Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia Luiz Capriglione (IEDE), no Rio de Janeiro, e do ambulatório de Endocrinologia da Santa Casa da Misericórdia de São Paulo. Não houve restrições referentes à idade do paciente, população, gênero nem local de nascimento. Foram excluídos pacientes com níveis de peptídeo C superior a 0,5 mg/dl.

O convite foi feito mediante Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexos 1 e 2) a cada paciente ou representante legal, aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, do Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia Luiz Capriglione e da Santa Casa da Misericórdia de São Paulo.

Após a permissão do paciente, realizou-se a punção de veia periférica para coleta de 10 ml de sangue venoso destinado a extração de DNA e 4 ml de sangue venoso para dosagem de peptídeo C, caso houvesse dúvidas no diagnóstico de DM1.

O sangue destinado à extração de DNA foi então acondicionado em tubos de ensaio fechado, estéril, contendo citrato ou EDTA, identificado e transportado até o Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e submetido à extração de DNA pela técnica Fenol/Clorofórmio com precipitação em etanol (anexo 3).

O sangue destinado à dosagem do peptídeo C foi acondicionado em tubo de ensaio seco, estéril e mantido sob refrigeração (submerso em gelo comum) até ser centrifugado por 10 minutos numa velocidade que pôde variar de 2.000 a 5.000 rotações por minuto, conforme a centrífuga utilizada no Laboratório de Análises Clínicas do IEDE ou no Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, de acordo com o local da coleta. Após a centrifugação, o soro que constituía o sobrenadante era retirado e congelado a uma temperatura de -20⁰C no Laboratório de Genética Molecular

da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e assim reservado para posterior análise, se necessária. O sedimento era desprezado em recipiente adequado para o descarte de resíduo biológico.

3.2- Avaliação Clínica

O presente estudo, buscando avaliar a importância de fatores genéticos na predisposição à retinopatia diabética, estabeleceu como primeira condição o diagnóstico de DM1 pela comprovada interferência desses fatores na fisiopatologia do próprio DM1 e pelo fato de pacientes portadores de DM2 apresentarem com maior frequência e intensidade fatores de risco para o dano vascular^{88,89}.

A avaliação clínica dos pacientes consistiu na investigação de fatores relacionados ao risco de complicações microvasculares em pacientes diabéticos e na investigação da presença ou ausência de retinopatia diabética proliferativa. Foram aferidos dados referentes ao tempo de doença e idade no diagnóstico de diabetes, presença de nefropatia, além das dosagens séricas de hemoglobina glicada, colesterol total e frações, bem como índice de massa corpórea (IMC) registrados nos prontuários médicos. A dosagem de hemoglobina glicada foi realizada através do método HPLC, e o colesterol total assim como a *High Density Lipoprotein* (HDL) e os triglicerídeos pelo método enzimático (anexo 4).

A presença ou ausência de RDP foi investigada por oftalmologista através da fundoscopia indireta realizada no mesmo período em que realizou-se a coleta de sangue para extração de DNA.

3.3- Análise Molecular

A análise dos polimorfismos da região promotora e do primeiro *éxon* do gene *VEGF-A* foi realizada a partir da técnica de PCR (reação em cadeia de polimerase) com posterior eletroforese em gel de poliacrilamida, no caso da deleção, ou digestão por endonuclease de restrição e análise por eletroforese em gel de agarose a 3%, no caso do polimorfismo rs833061, conforme técnicas padronizadas nos anexos 3, 5 e 6²⁶.

3.3.1- PCR (Polymerase Chain Reaction)

Consiste na amplificação *in vitro* de um fragmento específico de DNA sob condições ideais pré-determinadas que tem como instrumento principal uma enzima polimerase termoestável. Permite a geração de milhões de cópias, ou amplificação, de uma sequência específica de DNA. Este é um dos principais métodos empregados em biologia molecular e tem inúmeras aplicações médicas ^{76, 77, 91}.

Compreende três fases principais: desnaturação, anelamento e extensão. Na fase de desnaturação ocorre a separação dos dois filamentos componentes da dupla hélice de DNA. Uma falha nesta fase é causa comum de insucesso da PCR por prejudicar a fase seguinte de anelamento. Ocorre sob temperaturas acima de 90° C, geralmente 94° C. Uma vez separadas as fitas de DNA e sob temperaturas específicas determinadas conforme o comprimento, a concentração e o percentual de G-C de cada *primer*, há o anelamento destes a cada segmento complementar na fita correspondente. *Primers* são oligonucleotídeos sintetizados artificialmente que irão flanquear a região a ser amplificada. A temperatura de anelamento é altamente específica e variações de 1-2° C podem determinar a amplificação de um fragmento específico ou a amplificação de fragmentos não desejados. A temperatura de anelamento pode ser inferida por programas de computador, mas sabe-se que está próxima da *T_m* tida como a temperatura em que 50% do DNA permanece como fita única e é determinada pela fórmula: $T = 4 \times (G + C) = 2 \times (A + T)$, onde A, T, G e C correspondem às quantidades relativas de adenina, timina, guanina e citosina.

Após o anelamento dos *primers*, há a extensão do fragmento a partir dos primers flanqueadores pela polimerase. Geralmente essa fase ocorre a 72°C, que é a temperatura ótima de atuação da *Taq* polimerase. A meia-vida da *Taq* polimerase é superior a duas horas a 92,5° C, 40 minutos a 95° C e cinco minutos a 97,5° C. Quando a temperatura de anelamento é superior a 60° C, pode-se combinar as fases de anelamento e extensão ²⁵.

3.3.2- Digestão Enzimática

Endonucleases de restrição são enzimas com a capacidade de reconhecer e se ligar uma sequência específica de DNA e promover sua quebra em dois fragmentos distintos equimolares, nesse local ou em outro mais afastado. Na grande maioria dos casos, atuam sobre a molécula de DNA em dupla fita, apresentando-se como dímeros cujos sítios ativos se ligarão cada um a uma sequência polipeptídica. A alta especificidade ao reconhecer um sítio específico faz com que essas enzimas sejam utilizadas para o reconhecimento de mutações, pois a presença ou ausência de um nucleotídeo poderá gerar ou anular um sítio de restrição e, a partir daí, permitir ou impedir respectivamente a digestão enzimática e divisão do fragmento. Este é o fundamento da chamada RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorfism*). As sequências específicas reconhecidas variam de comprimento, tendo geralmente um mínimo de quatro nucleotídeos, e na maioria das vezes, são palindrômicas. Há ainda aquelas cuja sequência reconhecida é degenerada. Endonucleases de restrição quebram a molécula de DNA formando extremidades que podem ser irregulares, também chamadas coesivas ou cegas²⁷.

3.3.3- Aplicação dos Métodos

A análise da deleção de 18 pares de bases na posição -2549 da região promotora do gene *VEGF* foi realizada a partir da amplificação do fragmento compreendido entre -2610 e -2478 com a técnica de PCR utilizando o par de *primers* desenhado no laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética Médica da FCM/Unicamp, descrito na tabela 3, e os demais reagentes na tabela 4, num volume final de 25 µl. Todos os reagentes utilizados foram da marca Invitrogen[®] (Carlsbad, CA, EUA). O produto final desta reação deverá ter o tamanho correspondente a 152 bp.

Tabela 3- Par de Primers para PCR /Deleção

<i>Primer.</i>	<i>Seqüência</i>
<i>Primer F</i>	5' AAGCTCAGGTGACTAGGTGA3'
<i>Primer R</i>	5' ATATAACCTGGCTGTGACCT3'

Tabela 4- Reagentes utilizados por amostra em PCR/deleção.

	Reagente	Quantidade/Concentração
1	DNA genômico	65 nmol
2	Tampão	2,5 µl/1x
3	MgCl	0,8µl/ 4mM
4	DNTP (mix deoxinucleotídeos)	5,0 mmol
5	<i>Primer F</i>	200pmol
6	<i>Primer R</i>	200pmol
7	Polimerase (<i>Taq</i>)	2,5 U
8	Água	Para completar 2µl

Volume Final: 25µl

As amostras foram expostas a uma temperatura de 94° C por cinco minutos, seguida por 35 ciclos com 94° C por um minuto, 62° C por 30 segundos, 72° C por um minuto, e a uma extensão final a 72° C por 10 minutos.

O produto da PCR (anexo 7) foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (anexo 5) por 180 a 240 minutos, a 100 volts, com posterior impregnação em brometo de etídeo e registro fotográfico (figura 1). Na presença da deleção espera-se uma migração mais veloz do fragmento caso haja a deleção, devido ao seu menor tamanho. Tanto a PCR quanto a eletroforese foram feitos em duplicata.

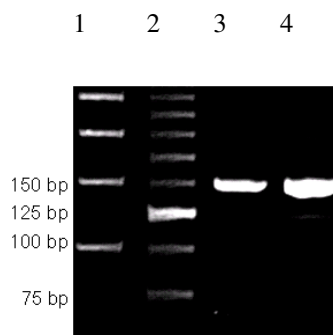


Figura 1- Eletroforese do Produto da PCR referente à deleção em -2549 na região promotora do gene *VEGF*. Colunas 1 e 2 : Marcador de peso molecular. Colunas 3 e 4 : Amostras de pacientes

Para a análise do polimorfismo rs833061 a técnica de PCR foi aplicada utilizando um par de *primers* descrito por Watson et al. (2000)⁹⁹ (tabela 5). O penúltimo nucleotídeo foi modificado com o intuito de criar um sítio de restrição para a posterior digestão enzimática. Os componentes da reação e suas concentrações são descritos na tabela 6.

Tabela 5- Par de Primers para PCR /-460

<i>Primer</i>	Seqüência
<i>Primer F</i>	5' TGTGCGTGTGGGGTTGAGCG3'
<i>Primer R</i>	5' TACGTGCGGACAGGGCCTGA3'

Tabela 6- Reagentes utilizados por amostra em PCR para análise de -460.

	Reagente	Quantidade/Concentração
1	DNA genômico	130 nmol
2	Tampão	1X/5µl
3	MgCl	4mM
4	DNTP (mix deoxinucleotídeos)	5mM
5	<i>Primer F</i>	400pmol
6	<i>Primer R</i>	400pmol
7	Polimerase (<i>Taq</i>)	5,0 unidades
8	Água	Para completar 50µl

Volume Final: 50 µl

As amostras foram submetidas a uma temperatura de 94° C por cinco minutos, seguida por 40 ciclos com 94° C por um minuto, 67° C por 30 segundos, 72° C por um minuto e a uma extensão final a 72° C por 10 minutos. O registro fotográfico do produto dessa PCR está exposto na figura 2.

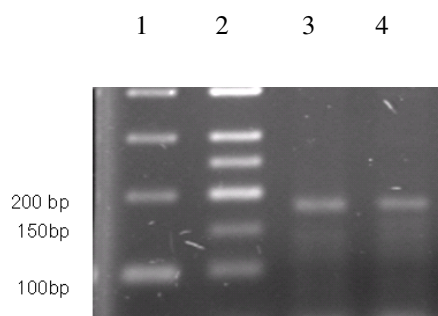


Figura 2- Eletroforese em gel de agarose referente ao polimorfismo rs833061.

1- Marcador 100bp, 2- Marcador 50 bp, 3-4 Produto da PCR.

A digestão do fragmento foi realizada com a enzima BsmU I que reconhece a sequência 5' CGCG 3', presente no produto da PCR (177 pares de bases) (anexo 7) a ser digerido caso o paciente tenha o genótipo CC ou CT. No primeiro caso espera-se que haja digestão total, com a formação de dois fragmentos de 155 e 22 pares de bases.

A digestão de cada amostra foi realizada utilizando reagentes descritos na tabela 7 e seguida por incubação durante 16 horas a 60° C.

Tabela 7- Reagentes utilizados por amostra em digestão para análise do polimorfismo rs833061

Reagente	Quantidade/Concentração
DNA (produto da PCR)	20µl
Enzima BsmU I	1µl / 10 unidades
Tampão	2,7µl / 1 x
Água	2,7µl

Para estabelecer o protocolo ideal de digestão, foi utilizado um controle positivo com o sítio de restrição da enzima em homozigose, sendo considerado ideal o protocolo após sua digestão total. Foram submetidos à eletroforese, aos pares, lado a lado, o produto da PCR e o produto da digestão enzimática referentes a cada paciente. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 3% (anexo 6) por 120 minutos a 100 volts, com posterior impregnação em brometo de etídeo e registro fotográfico (figuras 13 e 14). Os experimentos referentes a esse polimorfismo também foram feitos em duplicata.



Figura 3- Digestão total. Controle negativo gentilmente cedido por L. Rueda.

1-Marcador de peso molecular. 2 e 4 produtos da PCR. 3 e 5- Produtos da digestão

O segundo fragmento (menor) não está visível por ter migrado mais rapidamente.

4- RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram avaliados 96 indivíduos do Ambulatório de Endocrinologia do HC da Unicamp. Desses, somente 64 realizaram a avaliação oftalmológica necessária para a sua inclusão no estudo. O restrito contingente de sujeitos desse serviço fez necessária inclusão de pacientes oriundos de outros centros especializados como o IEDE, no Rio de Janeiro, de onde vieram 50 pacientes, e da Santa Casa de São Paulo, de onde vieram outros 50 pacientes. Do total de 164 indivíduos, somente 127 tinham em seus prontuários médicos dados necessários para a avaliação clínica e compuseram a amostra final. As mulheres representaram 63% (80) da amostra e os homens, 37% (47).

Os pacientes foram subdivididos em dois grupos principais com e sem retinopatia diabética proliferativa. Co-variáveis contínuas e discretas tiveram sua possível ligação a tal doença analisada, sendo proposto um modelo de regressão logística com as variáveis que se mostrarem significativas para cada grupo.

A proporção de pacientes com RDP na amostra é de 0,2047 (20,47%). Segundo o WESDR a prevalência de retinopatia diabética proliferativa em pacientes com diabetes diagnosticado antes dos 30 anos foi de 23%⁵⁴. Para testar se a diferença entre a proporção encontrada na amostra e a populacional é significativa, foi feito um Teste t para Proporção. A estatística do teste -0,7031 foi e o p-valor = 0,4833, logo, não houve diferença significativa entre as mesmas.

4.1- Variáveis contínuas clínicas

As variáveis contínuas estudadas foram:

- i) Idade no diagnóstico do DM1;
- ii) Tempo de diagnóstico de DM1;
- iii) Colesterol Total (Colest. Total);
- iv) HDL;
- v) LDL;
- vi) Triglicerídeos;
- vii) Índice de massa corpórea (IMC)
- viii) Hemoglobina Glicada (HbA1c)

Para verificar se havia diferenças significativas na distribuição de cada uma dessas variáveis entre os dois grupos avaliados (presença e ausência de RDP), foi aplicado o **Teste T** para comparação de médias. A variável triglicerídeos foi avaliada também com o **Teste de bondade**. A Tabela 8 apresenta os valores das médias de cada uma dessas variáveis nos grupos avaliados.

Tabela 8- Média das variáveis contínuas segundo ausência e presença de retinopatia.

Grupo	Média por grupo							
	Idade	Tempo	Colest. Total	HDL	LDL	Triglic.	HgG	
	(anos)	(anos)	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	IMC	%
Retinopatia								
ausente	11.753	17.447	172.550	53.573	98.493	91.756	24.620	9.372
Retinopatia								
presente	13.957	20.261	188.854	50.608	114.231	140.377	25.034	8.819

A Tabela 9 apresenta os valores médios de triglicerídeos séricos e hemoglobina glicada em mulheres e homens.

Tabela 9- Níveis séricos de triglicerídeos e hemoglobina glicada em mulheres e homens.

Sexo	Níveis séricos	
	Triglc séricos	Hemoglobina Glicada
	mg/dl	%
F	104.5091	9,3262
M	111,2833	9,1088

O valor p encontrado entre os sexos para a variável triglicerídeos foi 0,7374 e para a variável hemoglobina glicada foi 0,6319.

A Tabela 10 apresenta os resultados dos demais testes comparando as variáveis clínicas com a presença de RDP:

Tabela 10- Resultado dos Testes t comparando as médias entre os grupos. $p < 0,05$

Variáveis	N	Teste t (p-valor)
Idade no diagnóstico	108	0.2414
Tempo de doença	108	0.0984
Colest. Total	43	0.1627
HDL	43	0.5189
LDL	42	0.0985
Triglicerídeos.	40	0.0178
IMC	70	0.8334
HgG	77	0.2960

Para uma melhor ajuste da variável triglicerídeos foi realizado o teste de bondade (tabela 11).

Tabela 11- Teste de bondade de ajuste para o modelo logístico

Testes		
Number of obs	=	112
LR chi2(2)	=	25.3
Prob > chi2	=	0

4.2- Variáveis Discretas Clínicas

As co-variáveis discretas estudadas foram:

- i) Origem do paciente (IEDE, Santa Casa ou Unicamp).
- ii) Sexo (masculino, feminino);
- iii) População (negróide, caucasóide).
- iv) Nefropatia (ausência, presença).

Pra a análise dessas variáveis foi utilizado o **Teste Qui-quadrado** (X^2). A tabela 12 apresenta a frequência de retinopatia em mulheres e homens.

Tabela 12- Percentual de RDP por sexo

Retinopatia	Sexo		Total
	F	M	
Ausente	85.0% (68)	70.2% (33)	79.5% (101)
Presente	15.0% (12)	29.8% (14)	20.5% (26)
Total	100.0% (80)	100.0% (47)	100.0% (127)

As tabelas 13 a 16 apresentam as frequências absolutas e relativas de cada categoria de variáveis mencionadas acima por ausência e presença de RDP.

Tabela 13- Frequências relativas: RDP x Origem

Retinopatia	Origem			Total
	IEDE	Sta Casa	Unicamp	
Ausente	76.9% (20)	89.2% (33)	75.0% (48)	79.5% (101)
Presente	23.1% (6)	10.8% (4)	25.0% (16)	20.5% (26)
Total	100.0% (26)	100.0% (37)	100.0% (64)	100.0% (127)

Tabela 14- Frequências relativas: RDP x População

Retinopatia	População		Total
	Negróide	Caucasóide	
Ausente	85.7% (12)	78.3% (54)	79.5% (66)
Presente	14.3% (2)	21.7% (15)	20.5% (17)
Total	100.0% (14)	100.0% (69)	100.0% (83)

Tabela 15- Frequências relativas: Retinopatia X nefropatia

Retinopatia	Nefropatia		Total
	Ausente	Presente	
Ausente	90.4% (75)	48.3% (14)	79.5% (89)
Presente	9.6% (8)	51.7% (15)	20.5% (23)
Total	100.0% (83)	100.0% (29)	100.0% (112)

Tabela 16- Frequências relativas: nefropatia X sexo

Sexo	Nefropatia		Total
	Ausente	Presente	
Feminino	78,38% (58)	21,62% (16)	100,00% (74)
Masculino	65,79% (25)	34,21% (13)	100,00% (38)
Total	100.0% (83)	100.0% (29)	100.0% (112)

Tabela 17- Resultados dos testes Qui-quadrados para as Tabelas de 10 a 14.

Variáveis	N	valor p	X ²	g.l.
Origem	127	0.219	3.036	2
Sexo	127	0.046	3.976	1
População	83	0.529	0.397	1
Nefropatia	112	<0.001	23.326	1

Tabela 18- Modelo Logístico para a presença ou ausência de retinopatia.

Modelo Logístico				
Co-variáveis	OR	E.P	Z	P>z
Sexo	3.080587	1.671068	2.07	0.038
Nefropatia	9.628426	5.215098	4.18	0

As variáveis que apresentaram significância estatística a 5% foram sexo e nefropatia. Os homens apresentam uma maior proporção de RDP do que as mulheres, 29,8% e 15% respectivamente. Os pacientes com nefropatia presente apresentam maior proporção de RDP do que os que não apresentam nefropatia (51,7% e 9,6%, respectivamente).

4.3-Estudos Moleculares

Para a análise dos polimorfismos rs833061 (C/T) e a deleção de 18 bp em -2549 foi utilizado o **Teste Qui-quadrado**.

Nenhum paciente apresentou a deleção pesquisada na posição -2549 conforme representado na figura 4.

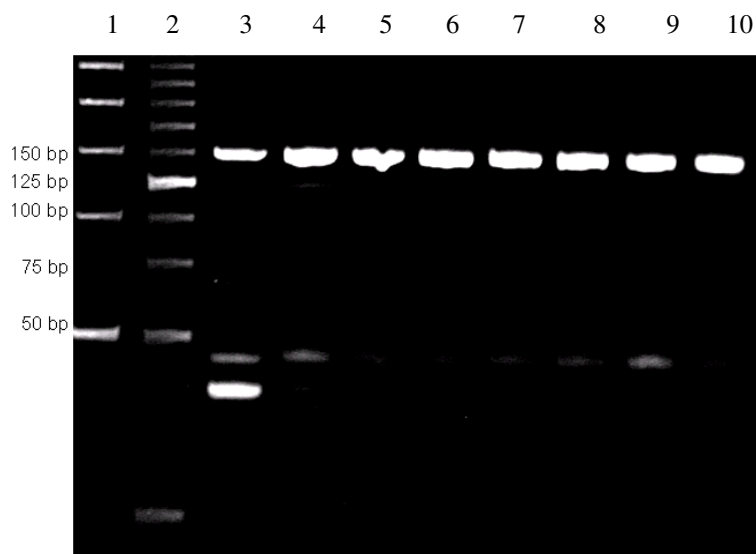


Figura 4- Eletroforese em gel de poliacrilamida para a deleção na posição -2549 do gene *VEGF*. Nenhuma das amostras apresenta a deleção. 1- Marcador 100bp, 2- Marcador 50bp, 3-10 produto da PCR.

Quanto ao polimorfismo rs833061 C/T, nenhum paciente apresentou o genótipo CC, 74 apresentaram o genótipo TC e 40 apresentaram o genótipo TT. A figura 5 ilustra os achados laboratoriais.

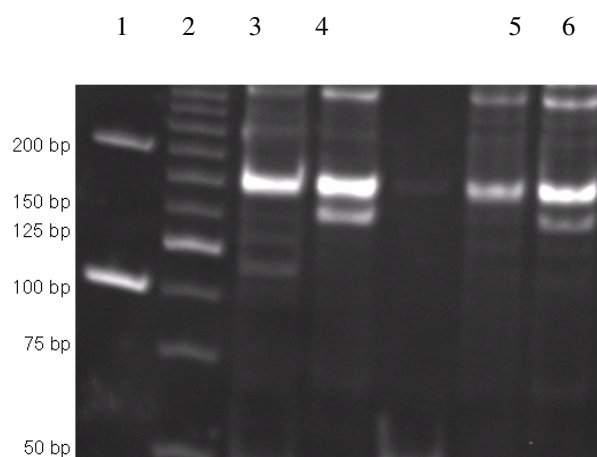


Figura 5- Digestão enzimática referente à genotipagem do polimorfismo rs833061. 1-Marcador 100bp, 2- Marcador 25 bp, 3-Produto PCR não exposto à endonuclease, 4 e 6- Produto da digestão (Heterozigoto CT), 5- Produto

exposto à enzima, não digerido (Homozigoto TT).

As frequências genóticas encontradas estão descritas a tabela 19 e o resultado do teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs833061 está indicado na tabela 20.

Tabela 19- Frequências relativas: Retinopatia X polimorfismo rs833061

Retinopatia	-460		Total
	TT	TC	
Ausente	90.0%	77.0%	81.6%
Presente	10.0%	23.0%	18.4%
Total	100.0%	100.0%	100.0%

Tabela 20- Resultados do teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs833061.

Variáveis	N	X ²	g.l.	valor p
Polimorfismo -460	114	2.908	1.000	0.088

4.4-Lei de Hardy-Weinberg

As frequências encontradas para cada genótipo do polimorfismo rs833061 foram: $n(TT) = 40$; $n(TC) = 74$; $n(CC) = 0$ E, portanto: $n(T) = 154$ e $n(C) = 74$ e $P_T = 0,6754$ e $P_C = 0,3246$.

A Tabela 21 apresenta os valores observados de cada classe, a probabilidade e o valor esperado segundo a Lei de Hardy-Weinberg (H-W).

Tabela 21- Valores observados de cada genótipo do polimorfismo rs833061 e os esperados segundo a Lei de H-W.

Classe	Observado	P	Esperado
TT	40	0.6754 ²	52
TC	74	2*0.6754*0.3246	50
CC	0	0.3246 ²	12
Total	114	1	114

O valor da análise estatística do X^2 é 26,2892 com 1 grau de liberdade e, portanto, o valor $p < 0,01$. A partir deste teste se conclui que os dados são significativamente diferentes dos preditos pela Lei de H-W.

As frequências alélicas descritas no *Ensemble Genome Browser* para o SNP rs833061 ¹¹⁵, por Watson et al. (2000) ⁹⁹ e do presente estudo são descritas na tabela 22.

Tabela 22- Frequências alélicas observadas no SNP rs833061

Fonte	Características da amostra	Número de indivíduos	Frequência alélica	
			C	T
Watson et al. ⁹⁹	Todos saudáveis	115	0,526	0,474
CEPH ¹¹⁵	Todos saudáveis	92	0,420	0,580
Lammer ¹¹⁵	Todos saudáveis	50	0,532	0,468
Ray et al ⁷³	Todos diabéticos e retinopatas (69 retinopatia diabética proliferativa, 198 outros graus de retinopatia)	267	0,49	0,51
Presente estudo	Todos diabéticos (26 com retinopatia diabética proliferativa, 88 com outros graus de retinopatia ou sem retinopatia).	114	0,33	0,67

Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os dados referidos por Lammer e o atual quanto às frequências alélicas, como pode ser visto na tabela 23.

E também entre o CEPH e o atual

Tabela 23- Valor P entre o presente estudo, CEPH e Lammer

Amostras	valor p
Presente estudo X CEPH	0.0374
Presente estudo X Lammer	<<0.01

Abaixo são dados intervalos de confiança de 5% e 1% para P_T e P_C .

Para $P_T = 0,6754$ IC(95%) = [0,5894 ; 0,7613] e IC(99%) = [0,5626 ; 0,7881]

Para $P_C = 0,3246$ IC(99%) = [0,2386 ; 0,4105] e IC(99%) = [0,2118 ; 0,4263].

Todas as variáveis estão discriminadas para cada paciente no anexo 8.

5- DISCUSSÃO

Nos últimos 20 anos, um grande número de trabalhos publicados em busca dos fundamentos genéticos de doenças complexas, como o DM, possibilitou um maior conhecimento sobre a sua fisiopatologia. Mas, até o momento, foi possível somente estabelecer associações entre alelos de alguns genes e a predisposição a essas doenças. Ainda não foi possível elucidar de maneira completa como esses alelos atuam em diferentes populações. Este estudo procurou analisar dois polimorfismos da região promotora do gene *VEGF* em uma amostra diversificada da população brasileira com o objetivo de compreender seu papel na predisposição à retinopatia diabética proliferativa, sendo também avaliadas variáveis clínicas de conhecido valor na fisiopatologia vascular.

A falta de informações no prontuário médico e o não comparecimento à avaliação oftalmológica foram as principais dificuldades enfrentadas para a realização deste estudo. Não obstante tais fatos, foi possível a aplicação de testes estatísticos para a análise da associação entre polimorfismos na região promotora do gene *VEGF*, fatores clínico-laboratoriais e retinopatia diabética proliferativa.

Durante a convocação dos pacientes e sua avaliação clínica, tornaram-se evidentes algumas deficiências estruturais na garantia do acesso à saúde no Brasil.

Examinando os prontuários médicos nos últimos cinco anos, ficou claro que estamos distantes da aplicação de protocolos internacionais para o acompanhamento clínico de pacientes diabéticos, o que, conseqüentemente dificulta a adequação de nossas pesquisas a padrões internacionais. As causas desse distanciamento vão desde a pouca informação dos pacientes sobre sua doença, a impossibilidade de manter uma dieta adequada associada à boa prática de atividade física, a necessidade de prescindir da consulta médica por conta do dia trabalhado até a falta de estrutura e o despreparo dos profissionais de saúde no cuidado dispensado a esses pacientes dos serviços da rede básica de atenção à saúde, que culminam com a sobrecarga dos serviços especializados. O somatório dessas dificuldades tem como conseqüência a impossibilidade de um acompanhamento clínico-laboratorial regular e de homogeneidade dos prontuários dos pacientes diabéticos.

Os principais motivos alegados para a abstenção do exame oftalmológico foram a impossibilidade financeira de deslocar-se de maneira independente, ou seja, a dependência do transporte público gratuito para o acesso ao serviço de Oftalmologia, e a impossibilidade de faltar ao trabalho.

Apesar de não constar da análise estatística desse trabalho, por fugir de seu objetivo principal, vale registrar que os cuidados domiciliares, tão importantes para os pacientes diabéticos, por sua importância secundária diante dos gastos com necessidades básicas, não são cumpridos. O DM é uma doença de manutenção cara para a maioria dos pacientes. Não é raro diminuir por conta própria a dose prescrita de insulina e não verificar regularmente a glicemia capilar nem a glicosúria, quando o material necessário não está disponível na rede pública de saúde.

Talvez este tenha sido um importante fator para a não associação entre retinopatia diabética e a manutenção de um estado hiperglicêmico, já que o estado hiperglicêmico predomina nos pacientes da amostra, como observado na tabela 8.

O DCCT, realizado na década de 80, com a duração de sete anos, procurou avaliar as vantagens de um tratamento intensivo visando a manutenção de níveis glicêmicos, inicialmente até 40% acima do limite superior da normalidade e, posteriormente, 60% na diminuição da incidência de complicações como retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética. Foi constatado que aqueles que receberam tratamento intensivo não somente evoluíram mais lentamente para essas complicações, como também apresentaram uma menor incidência das mesmas⁵².

Klein et al., entre 1982 e 1992, acompanharam 533 pacientes, 98,6% dos quais brancos e chegou às mesmas conclusões que o DCCT, considerando níveis toleráveis de hemoglobina glicada até 7,9% ⁵².

O presente estudo contou com a participação de 127 indivíduos, dos quais 29 apresentaram nefropatia (24,8%) e 26 (20,47%) apresentaram RDP. Tal resultado foi comparado com aquele do DCCT ⁵⁴, durante o qual ainda não era utilizada a classificação atual, mas é feita alusão ao diagnóstico de DM1 antes dos 30 anos de idade. Todos os

pacientes aqui avaliados tiveram seus diagnósticos firmados antes dos 30 anos. O valor de p após a análise estatística comparando essas duas amostras foi 0,4833, logo não houve diferença significativa entre esses percentuais.

Trinta e quatro (26,7%) pacientes tiveram valores de hemoglobina glicada menores ou iguais a 8,4%, 14 (11%) e nove (7%) iguais ou inferiores a 7,5 e 7% respectivamente. Tomando como referência os resultados do DCCT, não é possível inferir a intensidade da participação da hiperglicemia diante da interferência de fatores genéticos, nem o inverso, na predisposição à retinopatia diabética.

A única variável que apresentou diferença significativa entre os grupos a menos de 5% foi o nível sérico de triglicerídeos. Em média, os pacientes com retinopatia diabética proliferativa apresentam maiores níveis séricos de triglicerídeos (140,3) do que os pacientes com ausência desta complicação (91,3).

Conforme foi demonstrado em diferentes estudos, altos níveis séricos de triglicerídeos estiveram associados a um risco maior de desenvolvimento da retinopatia diabética proliferativa ⁷. Na presente amostra, os níveis séricos de triglicerídeos foram a única variável que diferiu significativamente entre os grupos, corroborando tais estudos.

O fundamento fisiopatológico, neste caso, porém, pode não estar estreitamente relacionado ao DM, já que de forma isolada a hipertrigliceridemia já constitui um fator de risco para doenças cardiovasculares ⁶⁹.

As recomendações para a prática clínica na manutenção de adultos diabéticos dislipidêmicos da Associação Americana de Diabetes ⁷ sugerem que o lipidograma seja realizado a cada ano em adultos e em crianças a partir dos dois anos de idade. A razão para tal é porque o controle glicêmico interfere nos níveis séricos das lipoproteínas.

Não houve diferença significativa entre o percentual de pacientes que apresentaram retinopatia diabética proliferativa na presente amostra e aquele descrito por Klein et al. (1984)⁵⁴. É importante lembrar que diante do grande número de estudos epidemiológicos sobre retinopatia diabética realizados e por conta das diferenças estruturais que trazem entre si, torna-se necessário uma maior homogeneidade entre eles para que seus resultados sejam realmente comparáveis ¹⁰¹.

Houve diferença significativa entre mulheres e homens quanto a frequência de RDP (tabela 17). Analisando tanto a presença de nefropatia, quanto os níveis séricos de triglicerídeos e hemoglobina glicada entre mulheres e homens, não houve diferença significativa e desta forma estas variáveis não justificam a maior prevalência de RDP em homens. Uma provável justificativa poderia ser o fato dos homens protelarem um pouco mais a procura por auxílio médico e, desta forma, serem geralmente admitidos num estado mais grave. Isso justificaria também o menor número de homens na amostra (quase 1/3 dos sujeitos). Para que seja possível confirmar tal hipótese, seria necessária uma comparação entre o estado clínico-laboratorial de mulheres e homens na sua admissão, o que não foi possível neste estudo devido à já discutida precariedade das informações nos prontuários médicos consultados.

Ainda quanto às co-variáveis discretas, não houve diferença significativa entre as populações negróide e caucasóide. O número de pacientes com ascendência considerada caucasóide (70) superou em cinco vezes o número de pacientes com ascendência negróide (14). Mas em 43 pacientes não foi possível supor a qual grupo pertenciam, em virtude de variações fenotípicas próprias ou pelo desconhecimento acerca de sua ascendência. A intensa miscigenação ocorrida no Brasil, assim como a falta de consciência racial, tornam extremamente difícil definir o grupo populacional estudado, ao contrário do ocorrido nos estudos realizados por Trautner et al. (1997) ⁹³ e Roy et al. (2004) ⁷⁴, entre outros, que estudaram exclusivamente caucasóides e negróides, respectivamente.

Não houve diferença significativa entre os pacientes em virtude de sua origem - Unicamp, IEDE ou Sta. Casa. A três instituições participantes deste estudo estão localizados em centros urbanos que, além de receber grande número de migrantes e descendentes de imigrantes, prestam serviço à população de suas regiões metropolitanas e de Estados vizinhos. Apesar dessa diversidade não é possível considerar tal amostra representativa da população brasileira.

As co-variáveis significativas no modelo foram presença de nefropatia e sexo. A interpretação para a Razão de Chances (OR) é a seguinte:

- i) os pacientes com nefropatia têm 9,6 mais chances de apresentar RPD em relação aos pacientes que não apresentaram nefropatia.
- ii) os pacientes do sexo masculino têm 3,1 mais chances de apresentar retinopatia do que os pacientes do sexo feminino.

Foi observada a associação entre retinopatia diabética e nefropatia diabética, em conformidade com o descrito na literatura médica ¹⁴ e fundamentado no que foi descrito durante a análise da fisiopatologia dos danos vasculares.

Até o momento, nenhum estudo demonstrou uma relação causal entre essas duas complicações no contexto do DM1. O mais provável é que elas sejam decorrentes de um mesmo mecanismo fisiopatológico ainda mal compreendido. Há participação do VEGF em ambas as complicações em virtude do aumento da permeabilidade vascular e da neovascularização, que podem ser conseqüentes ao aumento de sua expressão. A eritropoetina também tem sua participação fortemente implicada nessas complicações. Segundo o DCCT, um controle intenso dos níveis glicêmicos teve como conseqüência uma diminuição na incidência de microalbuminúria e proteinúria. A ausência de associação entre o polimorfismo rs833061 e nefropatia diabética já havia sido descrita anteriormente por Ray et al. (2004) ⁷³.

Ao contrário do que foi descrito por Ray et al. (2004) ⁷⁴, na presente amostra não houve associação entre o alelo C, forma selvagem do polimorfismo em questão, e a RDP. Também não houve associação entre tal alelo e nefropatia. Além disso, não houve nesta amostra nenhum paciente homozigoto para o alelo C e a distribuição alélica não esteve em conformidade com a lei de Hardy-Weinberg.

Segundo a Lei de Hardy-Weinberg “as frequências gênicas não serão alteradas e as proporções genotípicas atingirão seu equilíbrio estável, mostrando a mesma relação constante entre si ao longo do tempo”, mas para que isso aconteça, tal população deverá cumprir com os seguintes quesitos:

1. Ser infinitamente grande
2. Ter o mesmo número de mulheres e homens
3. Ter todos os casais igualmente férteis
4. Estar em panmixia
5. Não ter sobreposição de gerações
6. Não haver miscigenação com populações imigrantes
7. Seus genes em questão não sofrerem mutação
8. Não haver pressão seletiva conforme o genótipo¹⁰.

Considerando tais premissas, deve-se lembrar que a presente amostra não representa de maneira adequada as populações das cidades de Campinas, Rio de Janeiro e São Paulo. E que a Lei de Hardy-Weinberg refere-se a alelos na população em geral, e não a uma população portadora de um distúrbio definido.

Por este motivo é pertinente conhecer primeiro a frequência alélica na população geral de onde foram recrutados os componentes da amostra em questão. Tal dado ainda não foi estudado na população brasileira e não pôde ser realizado no presente estudo devido a limitações orçamentárias e de cronograma.

Outro aspecto na aplicação dessa lei refere-se ao próprio DM1 que, ao que tudo indica, tem um padrão não mendeliano de herança. Se a própria doença de base em questão parece ir além da condição poligênica, com uma importante participação ambiental, sendo considerada um distúrbio multifatorial, sempre devemos levar em consideração a possibilidade de suas complicações apresentarem esse mesmo padrão. Em conformidade com o que foi exposto na introdução, vários genes com diferentes alelos podem interferir na predisposição ao DM1 e o ambiente parece participar de maneira intensa como fator causal. Questiona-se, portanto, até que ponto estas variações não interferem também na predisposição as suas complicações.

A amostra de pacientes estudada foi obtida em serviços especializados, o que poderia gerar um viés levando a uma maior prevalência de RDP nessa amostra do que a observada em diversos outros trabalhos da literatura médica, como o de Klein et al. (1984)⁵⁴ entre outros, mas, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles quanto ao percentual de pacientes que desenvolveram RDP.

As frequências alélicas descritas na literatura, citadas anteriormente, foram apresentadas na tabela 22, sendo que houve diferença significativa quanto à frequência alélica entre as populações anteriormente estudadas e a amostra atual (tabela 23).

Ao comparar os resultados da presente amostra com aqueles da literatura internacional deve-se lembrar que o recrutamento de pacientes da amostra atual foi feito em duas grandes cidades do Estado de São Paulo e no Grande Rio abrangendo populações heterogêneas. Além disso, considerando a literatura, Watson et al.⁹⁹ não descrevem em seu trabalho a que grupo populacional se referiu. A autora afirma tratar-se de uma amostra racialmente mista e o CEPH avaliou uma população composta por caucasóides latinos hispânicos¹¹⁵. Por fim, a população avaliada por Lammer foi composta por negróides, caucasóides, latinos hispânicos e asiáticos¹¹⁵ sendo que a amostra de Ray et al. (2004)⁷³ foi composta unicamente por caucasóides.

Não é possível, somente com as variáveis consideradas até o momento justificar de maneira inequívoca a grande diferença encontrada entre a amostra atual e as demais. Porém, considerando os resultados obtidos na Inglaterra por Watson et al (2000)⁹⁹ e Ray et al. (2004)⁷³, que sugerem um aumento da atividade transcricional do alelo C quando comparado ao alelo T, e sua associação à retinopatia diabética, considerando ainda que a Organização Mundial de Saúde não estimou a progressão para retinopatia diabética, nem o percentual de incapacitados por esta complicação em diferentes países, e considerando por fim que a pressão seletiva imposta sobre a população estudada seja mais intensa que sobre as demais em virtude do ambiente.

Quanto à ausência de sujeitos com a deleção de 18 bp na amostra estudada, considerando que não há na literatura, até o momento, nenhuma outra publicação referente a tal polimorfismo além daquela de Yang et al., (2003)¹¹², não é possível desconsiderar a possibilidade de deriva gênica naquela população.

Finalmente, outra possível explicação para os resultados moleculares estaria no tamanho da presente amostra e na ausência de informação sobre a frequência desses alelos na população brasileira, sendo, portanto necessária a realização de estudos adicionais em pacientes brasileiros.

6- CONCLUSÕES

Na amostra analisada:

- 1- A proporção de pacientes com DM1 que desenvolveram RDP é compatível com o esperado segundo o WESDR.
- 2- Houve na presente amostra associação entre RDP e nefropatia, porém ainda não há justificativa para tal fato.
- 3- Houve, associação entre RDP e maiores níveis séricos de triglicerídeos, conforme descrição prévia na literatura internacional.
- 4- Não houve associação entre retinopatia diabética proliferativa, altos níveis de hemoglobina glicada, colesterol total, LDL, HDL, IMC, população, idade no diagnóstico e tempo de doença.
- 5- O percentual de homens acometidos pela retinopatia diabética proliferativa foi superior ao de mulheres, contrariamente ao já descrito na literatura internacional.
- 6- Nenhum indivíduo apresentou a deleção em -2549, sugerindo que tal alteração pode não ser significativa em nossa população.
- 7- Nenhum indivíduo apresentou a forma selvagem do polimorfismo rs833061 em homozigose, sugerindo que um provável mecanismo de seleção atue na população estudada.
- 8- O polimorfismo rs833061 não esteve em conformidade com a Lei de Hardy-Weinberg.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agardh D. HLA-DQB1*0201/0302 is associated with severe retinopathy in patients with IDDM. *Diabetologia*. 1996;39:1313-17.
2. Aiello LP; Gardner TW; King GL; Blankenship G; Cavallerano JD; Ferris FL. Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*. 1998.; 21:143-156.
3. American Diabetes Association. Diabetes Retinopathy. Clinical Practice Recommendation. 1998. <http://www.diabetes.org/for-health-professionals-and-scientists/cpr.jsp>. Acessado em 11/2005.
4. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2004; 27(suppl)1;s5-s10.
5. American Diabetes Association. Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2002. *Diabetes Care* 2003;26(3):917-32.
6. American Diabetes Association. Implications of the Diabetes Control and Complications Trial. Clinical Practice Recommendation. 1998.
7. American Diabetes Association. Management of dyslipidemia in adults with diabetes. Clinical Practice Recommendations. 1998.
8. Anderson S. Role of local and systemic angiotensin in diabetes renal disease. *Kidney Int*. 1997;63(Suppl);S107-10.
9. Banacerraf B; Mc Devitt HO; Histocompatibility linked immune response genes. *Science*. 1972;175:273-279.
10. Beiguelman B. A lei de Hardy e Weinberg. In Bernardo Beiguelman. A dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. 2ª. edição. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética; 1995;179-202.
11. Blom LA. High linear growth is associated with increased risk of childhood diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1992;35,528-33.
12. Bloomgarden ZT. Diabetic retinopathy and neuropathy. *Diabetes Care*. 2005;28(4),963-70.
13. Blum M; Eichhorn M; Vilser W. Hämodynamik und diabetische retinopathie. *Klin Monatsbl Augenheilkd*. 2005;222,246-70.

14. Brownlee M; Aiello LP; Friedman E; Vinik AI; Nesto RW; Boulton A. Complications of Diabetes Mellitus. In: Larsen PR; Kronenberg HM; Melmed S; Polonsky KS. Williams textbook of endocrinology. 10^a.edição. Saunders. Philadelphia. 2003,1509-83.
15. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature, 2001;414,813-16.
16. Clarke WL; Shaver KA et al. Autoimmunity in congenital rubella syndrome. J Pediatr. 1984;104, 370-73.
17. Clay e Derreumaux. Embryologie de l'œil et des ses annexes: Teratologie. In Encyclopédie Médico-Cirurgicale (Paris). Ophtalmologie. 1977; 4(21.080 A-10),15-70. *apud*: Dantas, A. Embriologia. In: Clínica Oftalmológica, Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1980,2-29.
18. Cogan DG; Touissan D et al. Retinal Vascular Patterns. IV Diabetic Retinopathy. Arch Ophthalmol 1961; 66:366-78.
19. Cudworth A.G. Type 1 Diabetes Mellitus. Diabetologia. 1978;11;281-91.
20. Cudworth AG; Gamble DR; White GBB; Lendrum R; Woodrow JC; Bloom A. Aetiology of diabetes. A prospective study. Lancet. 1977;I, 385-388. *apud* Codworth AG. Type I Diabetes Mellitus. Diabetologia. 1978;14.281-291.
21. Cudworth AG; Woodrow JC. Genetic susceptibility in diabetes mellitus: Analysis of HLA association. Br. Med. J. 1976;2,864-66.
22. Dahlquist G. Epidemiological studies of childhood insulin-dependent diabetes. Acta Paediatr Scand 1991;80,583-9.
23. Dahlquist G. The aetiology of type 1 diabetes: an epidemiological perspective. Acta Paediatr 1988;425(Suppl),5-10.
24. Dantas A. Embriologia, In: Dantas A. Clínica Oftalmológica. 2^a.edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1980,2-29

25. Davis LG. In vitro amplification of DNA using the polymerase chain reaction (PCR) and thermostable *Taq* DNA polymerase. In: Davis LG; Kuehl WM; Battey JF; Wonsiewicz M; Greenfield S. Basic Methods in Molecular Biology 2ª.edição. Appleton & Lange. Connecticut.1995,113-24.
26. Davis LG.Phenol/Chloroform Extraction and ethanol precipitation. In:Davis LG; Kuehl WM; Battey JF; Wonsiewicz M; Greenfield S. Basic Methods in Molecular Biology. 2ª.edição. Appleton & Lange Connecticut.1995,16-21.
27. Davis LG. Restriction Endonucleases and Methylases. In: Davis LG; Kuehl WM; Battey JF; Wonsiewicz M; Greenfield S. Basic Methods in Molecular Biology. 2ª.edição. Appleton & Lange. Connecticut.1995, 86-95.
28. De la Rubia G; Oliver FJ, et al. Induction of resistance to ET-1's biochemical actions by elevated glucose levels in retinal pericytes. Diabetes. 1992;41,1533-9
29. Departament of non-comunicable diseases surveillance. World Health Organization. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus.In: World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Genebra.1999,1-47.
30. Diabetes Care and Research in Europe: The St Vincent Declaration. World Health Organization. WHO. Regional Office for Europe,1989.
31. Diabetes Epidemiology Research International Group. Geographic patterns of childhood insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes. 1988;37(8),1113-9.
32. Diabetic Retinopathy: Clinical Practical Recomendations. American Diabetes Association. Diabetes Care. 1998;21,143-56.
33. Dorchy H. Introduction and overview. Acta Paediatrica (suppl), v.425, 1998.
34. Evans K; Bird AC. The genetics of complex ophthalmic disorders. Br J Ophthalmol.1996; 80,763-68.
35. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor..J Mol Med. 1999;77(7),527-43.

36. Gardner T; Aiello LP. Pathogenesis in diabetic retinopathy. In: Flynn HW; Smiddy WE. Diabetes and ocular disease. China. The Foundation of the American Academy of Ophthalmology. 2000,1-15. Ophthalmology Monographs.
37. Genc S; Koroglu T; Genc K. Erythropoietin and the nervous system. Brain research. 2004;1000,19-31.
38. Gleadle JM; Ebert BL; Firth JD et al. Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. Am J Physiol. 1995;268(6 Pt 1),C1362-68.
39. Grimm C; Wenzel A; Groszer M et al. Induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light induced retinal degeneration. Nat med 2002;8,718-724.
40. Haffner SM. Management of dyslipidemia in adults with diabetes. (Technical Review). Diabetes Care. 1998;21,160-178.
41. Hammes HP; Lin J et al. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. Diabetes. 2002;51,3107-12.
42. Harris H. The familial distribution of diabetes mellitus: A study of the relatives of 1241 diabetic probands. Ann Eugen. 1950;15,95-119.
43. Herman IM, D'Amore PA, et al. Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins. J Cell Biology. 1985;101,43-52.
44. Hyöty H; Hiltunen M; Knip M; Laakkonen H; Vähäsalo P; Karjalainen J et al. A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Diabetes. 1995;44,652-7.
45. Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation isozyme: specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. Diabetologia. 2001;44,659-73.
46. Jaquet K; Krause K; Tawakol-Khodai M et al. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. Microvasc Res. 2002;64,326-33.
47. Jin Q; Hemminki K; Equist K; Lenner P; Grzybowska E; Klaes R. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in relation to breast cancer development and prognosis. Clin Cancer Res. 2005;5(10),3647-53.

48. Jonnes N; Iljin K; Dumont DJ; Alitalo K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat ver Mol Cell Biol* 2001;2,257-267.
49. Karamanos B. Different risk factors of microangiopathy in patients with type 1 diabetes mellitus of short versus long duration. The EURODIAB IDDM complications study. *Diabetologia* 2000;43,348-55.
50. Katsura Y; Okano T; Matsuno K; Osako M; Kure M; Watanabe T et al . Erythropoietin is highly elevated in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes care* 2005;28(9),2252-54.
51. Kinoshita JH; Nishimura C. The involvement of aldose reductase in diabetic complications. *Diabetes Metab Rev.* 1988;4,323-37.
52. Klein R; Klein BE; Moss SE. Relation of glycemic control to diabetes microvascular complications in diabetes mellitus. Mechanisms of diabetic complications: The glucose hypothesis. *Ann Intern Med.*1996;124, 90-6
53. Klein R; Klein BEK; Moss SE. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy, II:prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol.* 1984;102,520-526.
54. Klein R; Klein BEK; Moss SE; Davis MD; De Mets DL. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy.III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol.*1984;102, 527-32.
55. Klein R; Zinman B; Gardiner R; Suissa S; Donnelly S; Sinaiko A et al. The relationship of diabetic retinopathy to preclinical diabetic glomerulopathy lesions in type 1 diabetic patients. *Diabetes.* 2005;54,527-33.
56. Koss MC. Functional role of nitric oxide in regulation of ocular blood flow. *Eur J Pharmacol* 1999;374(2),161-74.
57. Kroll J; Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2(KDR). *Biochem Biophys Res Commun*1998;252(3),743-46.
58. Kuwabara T; Cogan DG et al. Retinal Vascular Patterns. IV. Diabetic Retinopathy. *Arch Ophthalmol*1963;69,492-502.

59. Lawrence R.D. Types of human diabetes. Br. Med J. 1951;1, 373-5. *apud*. Cudworth A.G. Type 1 Diabetes Mellitus. Diabetologia. 1978;11,281-91.
60. Lawrence RD. Heredity in diabetes mellitus and renal glycosuria. In: Changes of Morbid Inheritance, Oxford: Blackwell, 332-45. 1934.*apud*. Cudworth A.G. Type 1 Diabetes Mellitus. Diabetologia. 1978;11,281-91.
61. Looker H. Longitudinal study of incidence and progression of diabetic retinopathy assessed by retinal photography in Pima Indians. Diabetes Care. 2003;26(2),320-6.
62. Mandarino LJ. Current hypothesis for the biochemical basis of the diabetic retinopathy. Diabetes Care. 1992;15(12),1892-901.
63. Mandrup-Pulsen T. On the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. Dan Med Bullv 1988;35,438-60.
64. Mc Devitt OH; Bodmer WF. HLA, immune response genes and disease. Lancet.1974,1269-1275.
65. Mesner MA; Forrest JM; Bransby RD. Rubella infection and diabetes mellitus. Lancet. 1978;1,57-60.
66. Moore TC; Moore JE; Kaji Y et al. The role of advanced glycation end products in retinal microvascular leukostasis. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003;44,4457-64.
67. Moss SE; Klein R; Klein BE. The 14 year incidence of visual loss in a diabetic population. Ophthalmology.1998;105, 985-1003. In: Neufeld G; Cohen T; Gengrinovich S; Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J.1999;(1),9-22)
68. Nelson PG; Pyke DA; Cudworth AG; Woodrow JC; Batchelor JR. Histocompatibility antigens in diabetic identical twins. Lancet II.1975,193-194.
69. Pejic RN; Lee DT. Hypertriglyceridemia. J Am Board Fam Med. 2006;19(3),310-6.
70. Pimazoni Neto A. et al. Proposta Básica para a Assistência ao Paciente Diabético no Município. Sociedade Brasileira de Diabetes e Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. 1999. *apud* www.sbd.com.br
acessado em 01/2006.

71. Polak M; Zagórski Z. Lipid peroxidation in diabetic retinopathy. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska*. 2004;59(1),434-37.
72. Rand LI; Krolewski AS; Aiello LM; Warram JH; Backer RS; Maki T. Multiple factors in the prediction of risk of proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med*. 1985;313, 1433-8.
73. Ray D; Mishra M; Ralph S; Read I; Davies R; Brenchley P. Association of the *VEGF* gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. *Diabetes*. 2004;53,861-4.
74. Roy MS et al. The prevalence of diabetic retinopathy among adult type 1 diabetic persons in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004;22,546-51.
75. Rubenstein P. The HLA system in congenital rubella patients with and without diabetes. *Diabetes*. 1982;31,1088-91.
76. Saiki RK; Gelfand DH; Stoffel S; Scharf SJ; Higuchi R; Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239, 487-91.
77. Saiki RK; Scharf S; Faloona F; Mullis KB; Horn GT; Erlich HA et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle anemia. *Science*. 1985;230,1350-54.
78. Schoch HJ; Fischer S; Marti H. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain*. 2002;125,2549-57.
79. Sharma N; Gardiner TA; Archer DB. A morphologic and autoradiographic study of cell death and regeneration in the retinal microvasculature of normal and diabetic rats. *Am J Ophthalmol*.1985;100,51-60.
80. Shiba T; Inoguchi T; Sportsman JR et al. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am J Physiol* 1993;265(5 Pt 1)E,783-93.
81. Silva M; Grillot D; Benito A et al. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res* 2004;1000,19-22.

82. Sociedade Brasileira de Diabetes. Classificação. In: Consenso Brasileiro sobre Diabetes: Diagnóstico e Classificação do Diabetes Melito e tratamento do diabetes melito tipo 2. Sociedade Brasileira de Diabetes. José Egídio Paulo de Oliveira. Diagraphic. Rio de Janeiro.2003,10-12.
83. Spitaler MM; Graier WF. Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus.diabetologia. 2002;45,476-94.
84. Stitt AW. The role of the advanced glycation in the pathogene of diabetes retinopathy. Experimental and Molecular Pathology. 2003;75,95-108.
85. Stitt W; McGoldrick C; Rice-McCaldin A; McCance DR; Glenn JV; Hsu DK; et al. Impaired retinal angiogenesis in diabetes. Diabetes. 2005;53,785-94.
86. Summers AM; Coupes BM; Brennan MF; Ralph SA; Short CD; Brenchley EC. *VEGF* - 460 genotype plays an important role in progression to chronic kidney disease stage 5. Nephrol Dial transpl. 2005;20,2427-32.
87. Tattersall RB; Pyke DA. Diabetes in identical twins. Lancet 1972;ii,1120-25
88. The Diabetes Control Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term.complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med. 1993;329,977-86.
89. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1997;20(7),1183-97.
90. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. Nature. 2005;27,1299-320.
91. The Polymerase Chain Reaction. In: Advanced Molecular Biology. Andrea Boscher. Oxford.BIOS Scientific Publischers Limited.1998, 279-85.
92. Torquato MT et al. Prevalence of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. São Paulo Med J. 2003;121(6),224-30.

93. Trautner C. Incidence of blindness in relation to diabetes. *Diabetes Care*. 1997;20(7),1147-53.
94. van den Enden MK et al. Elevated glucose levels increase retinal glycolysis and sorbitol pathway metabolism. Implications for diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36,1675-85.
95. van Hecke M; Dekker JM; Nijpels G et al. Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: The Hoorn Study. *Diabetologia* 2005;48,1300-60.
96. Viores AS; Campochiaro PA; Williams EH et al. Aldose reductase expression in human diabetic retina and retinal pigment epithelium. *Diabetes*. 1988; 37,1658-64.
97. Watanabe D; Suzuma K; Matsui S; Kurimoto M; Kiryu J; Kita M et al. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *Engl J Med*. 2005;353(8),782-92.
98. Watson CJ; Webb NJA; Bottomley MJ; Brenchley PEC. Peripheral mononuclear cell express *VEGF* and the VEGF receptor flt-1. *J. Amer. Soc Nephrol*. 1996;7(9),A2390.
99. Watson CJ; Wegg NJA; Bottomley MJ; Brenchley PEC. Identification of polymorphisms within the endothelial vascular growth factor (*VEGF*) gene: correlation with variation in *VEGF* protein production. *Cytokine* 2000;12(8),1232-35.
100. Wilkinson-Berka J. Vasoactive factors and diabetic retinopathy: vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2 and nitric oxide. *Curr Pharm Des*. 2004;10(27),3331-48
101. Williams R; Airey M. et al Epidemiology of diabetic retinopathy and macular oedema: a systematic review. *Eye*. 2004 Oct;18(10),963-83.
102. Williamson JR; Chang K; Frangos M et al, Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*. 1993;42, 801-13.
103. Yabe-Nishimura C. Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacol Rev*. 1998;50,21-33.
104. Yamagishi S; Amano S; Inagaki Y et al. Advanced glycation end products-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor in bovine retinal pericytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290,973-978.

105. Yamagishi S; Edelstein D; Du XL et al. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes*. 2001;50,1491-4.
106. Yamagishi S; Fugimori H; Vonekura H et al. Advanced glycation end products inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia*. 1998;41,1435-41.
107. Yamagishi S; Hsu C; Kobayashi K; Yamamoto H. Endothelin mediates endothelial cell dependent proliferation of vascular pericytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993;191(3),840-6.
108. Yamagishi S; Hsu CC; Taniguchi M et al.. Receptor-mediated toxicity to pericytes of advanced glycosylation end products: a possible mechanism of pericyte loss in diabetic microangiopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;213,681-7.
109. Yamagishi S; Imaizumi T. Diabetic vascular complications: Pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. *Curr pharm des* 2005;11,2279-99.
110. Yamagishi S; Kobayashi K; Yamamoto H. Pericytes not only regulate growth, but also preserve prostacyclin-producing ability and protect against lipid peroxide-induced injury of cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;26,1455-62.
111. Yamagishi S; Yamamoto Y; Harada S et al. Advanced glycation end products stimulate the growth but inhibit the prostacyclin producing ability of endothelial cells through interactions with their receptors. *FEBS (Lett)*1996;384,103-6.
112. Yang B; Cross DF; Ollerenshaw M; Millward BA; Demaine AG. Polymorphisms of the vascular endothelial growth factor and susceptibility to diabetic microvascular complications in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Diab Compl*. 2003;17,1-6.
113. Yoshiya K; Okana T; Matsuno K; Osako M; Kure M; Watanabe T et al. Erythropoietin Is Highly Elevated in Vitreous Fluid of Patients With Proliferative Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*. 2005;28,2252-4.

114. Censo populacional 2000. IBGE. <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em 07/07/2006.
115. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/snpview?snp=rs833061. Acessado em 06/2006

8- ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNICAMP

Título do Protocolo de Pesquisa:

“Estudos Moleculares na Retinopatia Diabética”

1-NOME DO PACIENTE.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO
Nº COMPLEMENTO:
BAIRRO:..... CIDADE
CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO
Nº COMPLEMENTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

Eu, _____, recebi explicações sobre a coleta de 10 ml de sangue, para exame de laboratório relacionado a minha doença (diabetes mellitus tipo 1, com ou sem retinopatia diabética) e sobre o objetivo desse estudo que visa única e exclusivamente a identificação de gene(s) de predisposição para retinopatia em pessoas com diabetes.

Fui informado(a) que a minha participação nesse estudo não incorre em nenhum risco e nenhum desconforto adicional além dos relacionados com a coleta de sangue (dor, hematoma e desconforto local, transitórios), que não haverá nenhum benefício direto para a minha pessoa além da realização do exame oftalmológico para análise da retina (fundoscopia/retinografia), que não será divulgada qualquer informação que permita a minha identificação e que as informações geradas durante o projeto que possam ter implicações no meu atendimento serão comunicados aos médicos responsáveis e à minha pessoa, embora não sejam previstos resultados individuais com finalidade preditiva ou de aconselhamento genético.

Caso tenha dúvidas, poderei entrar em contato com a pesquisadora Nilma Almeida de Assis no telefone (19) 3788-8907, no Departamento de Genética Médica, ou com o Comitê de Ética da FCM/Unicamp pelo telefone (19) 3788-8936.

Se eu não concordar com esta coleta ou desejar interromper minha participação a qualquer momento, não haverá nenhum prejuízo ao meu tratamento, podendo ainda retirar a amostra colhida se assim o proceder.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em realizar este exame.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 2005.

Assinatura do paciente ou responsável legal

Nilma Almeida de Assis CRM 52.69774-5

ANEXO 2

Termo de consentimento II



UNICAMP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Protocolo de Pesquisa:

“Estudos Moleculares na Retinopatia Diabética”

Autorizo o armazenamento de material biológico (amostras de DNA), por 05 (cinco) anos a partir da presente data, no Laboratório de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp. Fui informado que, se houver interesse em utilizar este material para futuros exames, um novo termo de consentimento livre e esclarecido deverá ser apresentado à minha pessoa e (ou) nova consulta ao Comitê de Ética em Pesquisa deverá ser realizada. Fui informado ainda que, se não autorizar o armazenamento, esse material será destruído ao final desta pesquisa. Fui informado também que tanto este termo de consentimento livre e esclarecido, como também o armazenamento do deste material estão em cumprimento com a resolução CNS nº 347 de janeiro de 2005 que regulamenta o armazenamento e utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 2005.

Assinatura do paciente ou responsável legal

Nilma Almeida de Assis
CRM 52.69774-5

ANEXO 3

Extração de DNA Método Fenol/Clorofórmio

Método empregado no Laboratório de Genética Molecular da FCM/Unicamp (Modificado de: Davis LG. Phenol/Chloroform Extraction and ethanol precipitation. In. Davis L G, Kuehl W M, Battey J F. Wonsiewicz M, Greenfield S. Basic Methods in Molecular Biology Segunda edição. Connecticut, EUA. 1995.Appleton & Lange).

1. Centrifugação do sangue por 10 minutos a 1900 rpm
2. Remoção do sedimento para tubo Falcon 15 ml
3. Adição de RSB 1X até completar volume final de 11 ml
4. Adição de 60 µl de Nonidet P40 (Triton ou Iguefal).
5. Oscilação por 10 minutos.
6. Centrifugação por 10 minutos a 2500 rpm
7. Desprezo do sobrenadante
8. Diluição do pellet em 0,5 ml de RSB 1X.
9. Adição de 3 ml de SDS (solução para sangue) .
10. Adição de 80 µl de proteinase K (100 µl/ml).
11. Incubação por 2 a 3 horas a 37 °C.
12. Adição de 3 ml de fenol saturado
13. Oscilação por 10 minutos
14. Centrifugação por 10 minutos a 2500 rpm
15. Transferência do sobrenadante para tubo falcon 15 ml

16. Adição de 1,5 ml de clorofórmio-álcool isoamílico e 1,5 ml de fenol saturado
17. Oscilação por 10 minutos
18. Centrifugação por 10 minutos a 2500 rpm
19. Remoção do sedimento
20. Adição de 3 ml de clorofórmio-álcool isoamílico
21. Oscilação por 10 minutos
22. Centrifugação por 10 minutos a 2500 rpm
23. Remoção do sedimento
24. Adição de 6 ml de etanol 100%
25. Oscilação suave do tubo até observar a precipitação do DNA.
26. Retirada do DNA com pipeta
27. Diluição do DNA em 200 a 250 μ l de TE pH 8,0

ANEXO 4

Método utilizado para a dosagem de hemoglobina glicada (HbA1c) :

HPLC - Troca iônica

Aparelho Bio-Rad Variant IIA1c da empresa Bio-Rad Laboratories (Bio-Rad, USA) certificada pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP). Os métodos certificados pelo NGSP têm resultados de HbA1c equivalentes aos obtidos pelo método empregado no DCCT, que também foi HPLC.

Método utilizado para a dosagem de colesterol total, HDL e triglicerídeos:

Método enzimático, conforme o kit destinado a cada variável. O kit utilizado foi do laboratório Roche ® (F. Hoffman- La Roche AG, Basiléia, Suíça), no aparelho MODULAR®.

ANEXO 5

Preparo do gel de Poliacrilamida

1-Água	12,45 ml
2-TBE 10 X	2,1 ml
3-Acrilamida 40%	6,3 ml
4- TEMED	24,5 µl
5- Persulfato de Amônio	147 µl

Misturar os componentes na ordem apresentada e verter entre as placa de eletroforese. Aguardar 30-60 minutos antes de aplicar as amostras, para que haja polimerização satisfatória.

Eletroforese

Aplicar 18 µl de cada amostra. Submeter o gel a uma ddp de 150 volts por 4 horas.

Expor o gel a solução de brometo de etídeo (2µg/ml) por 10 minutos.

Observar sob radiação Ultra-violeta.

ANEXO 6

Preparo do gel de Agarose a 3%

- 1- TBE1x 100 ml
- 2- Agarose anidra 3g
- 3-

Misturar os componentes e aquecer a mistura até homogeneizá-la por completo.

Aguardar 60 minutos até a polimerização adequada antes de aplicar as amostras.

Eletroforese

Aplicar 15µl de cada amostra. Submeter o gel a uma ddp de 100 volts por 2 horas.

Expor o gel a solução de brometo de etídeo (2µg/ml) por 10 minutos.

Observar sob radiação Ultra-violeta.

ANEXO 7

Seqüência de bases nitrogenadas dos produtos das PCR.

Para pesquisa da deleção em -2549:

5' **AAGCTCAGGTGACTAGGTGACTTGAGCTTTTAATTTGGTGACAATGTGGGC**
ACTGGCTGAGTCCTTAAGAGTACATTGTTGTAAATGCCGGTGACAACACACTGG
GGCATGGGATCCAGAGTTAACCCCTCCAGGTCACAGCCAGGTTATAT 3'

Em negrito estão indicados os *Primers*. O fragmento referente à deleção está sublinhado.

Para a pesquisa do SNP rs833061:

5' **TGTGCGTGTGGGGTTGAGG/CGC**/TGTTGGAGCGGGGAGAAGGCCAGGGGT
CACTCCAGGATTCCAATAGATCTGTGTGTCCCTCTCCCCACCCGTCCCTGTCCG
GCTCTCCGCCTTCCCCTGCCCCCTTCAATATTCCTAGCAAAGAGGGAACGGCTC
TCAGGCCCTGTCCGCACGTA3'

Em negrito estão indicados os *primers*. A penúltima guanina do *primer foward* foi trocada por uma citosina para a criação de um sítio de reconhecimento da enzima BsmU I e ambas estão sublinhadas. O SNP rs833061 está representado em itálico ⁹⁹.

ANEXO 8

Tabela de resultados observados para cada paciente

Registro no Laboratório	Origem	Reg origem	Idade Diag DM	Tempo de dça	Retina	sexo	população	hemoglobina	nefropatia	colest.total	hdl	ldl	trigl	IMC	Deleção		-460		
					pres=1, aus=2	mulher=1, homem=2	negroide=1 caucasoid=2,	glicosilada	Pres.=1, Aus.=2						sim=1	não=2	TT=1	TC=2	CC=3
1138/05	IEDE	28313	24	12	1	1		9,00	2	197,30	37,00	106,50	311,80	33,6		2	1		
1124/05	IEDE	54385	14	10	2	1	1	8,40	2	145,00				26,3		2		2	
1102/05	IEDE	22799	9	24	2	1	2	6,70		179,30	63,00	91,00	102,00	25,0		2		2	
1133/05	IEDE	43389	22	12	2	2	2	12,90	2	234,00	61,50	76,00	21,00			2	1		
1139/05	IEDE	1	15	12	2	2										2			
1127/05	IEDE	60455	22	14	1	1	2	5,60	1	181,00	50,00	105,00	111,00			2		2	
1140/05	IEDE	33777	20	18	2	1	2	7,00	2	152,00	72,00	77,50	46,30	25,2		2	1		
1106/05	IEDE	56468	10	25	1	2	2	8,30	2	175,00	69,00	92,00	87,00			2		2	
1103/05	IEDE	1	1	39	2	2										2		2	
1100/05	IEDE	33952	9	20	2	2		7,65	2	126,00	42,00	52,00	162,00	25,4		2	1		
1122/05	IEDE	43342	21	16	2	1		7,70		141,00	66,00	65,60	45,60			2		2	
1105/05	IEDE	40067	10	15	2	2		6,90	2	143,00	38,60	78,00	132,00			2	1		
1097/05	IEDE	44325	11	31	1	2	2	8,90	2	227,00	70,50	131,00	95,50	23,4		2	1		
1109/05	IEDE	44560	10	13	2	2	2	12,20	2	113,80	54,60	47,30	51,50	23,0		2	1		
1118/05	IEDE	44220	18	27	2	2	1	7,80		221,60	40,60	149,50	104,00	21,2		2			
1119/05	IEDE	30305	15	26	2	1	2	10,50	2	195,00	68,00	105,00	67,30	22,5		2		2	
1120/05	IEDE	41160	22	29	2	1	1	5,60	2	182,00	64,00	90,00	137,00	25,3		2		2	
1131/05	IEDE		7	25	1	1	2									2	1		
1114/05	IEDE	23836	12	25	2	2	1	10,96	2	182,00	49,00	116,00		25,4		2	1		
1110/05	IEDE	39091	5	16	2	2	2	8,90	2	111,40	41,60	53,20	68,30	21,9		2	1		
1130/05	IEDE		30	11	1	2										2			
1099/05	IEDE	13134	10	34	2	2			1		33,00			63,7		2		2	
1115/05	IEDE	44325	18	17	2	1	1	7,90	2	197,40	67,30	111,50	67,50	21,1		2		2	
1144/05	IEDE	60062	9	14	2	1	1	13,30	2	216,00	58,00	124,00		21,1		2	1		
1134/05	IEDE	35167	18	20	2	1	1	6,90	2	161,00	28,00	95,50	178,00	29,6		2	1		
1104/05	IEDE		14	15	2	2										2	1		
1179/03	Sta Casa	741550	5	10	2	2	2	11,90								2	1		

2118/04	Sta Casa		13	10	2	2	2	9,10						28,0		2		2	
155/04	Sta Casa	645095	3	14	2	2			2							2	1		
977/03	Sta Casa		4	10	2	2	2	7,20	2					22,0		2	1		
761/04	Sta Casa		3	13	2	1	2	10,00	2					21,3		2		2	
1010/03	Sta Casa	351346	1	19	2	1	2	8,20	2					20,9		2			
2307/04	Sta Casa		7	10	2	1		10,50	2					21,6		2		2	
1609/03	Sta Casa	5990	2	15	2	2	2		2					18,8		2		2	
1191/03	Sta Casa	711412	9	11	2	2	2	9,40	2					18,6		2		2	
150/04	Sta Casa		31	26	1	1	1	10,80	1					25,0		2	1		
960/03	Sta Casa	631701	1	17	2	1	2	9,12	1					20,5		2	1		
1724/03	Sta Casa		4	14	2	1	2	7,60	2					23,2		2	1		
1723/03	Sta Casa	211900	3	20	2	1			2							2		2	
961/03	Sta Casa	385543	11	12	2	1		12,20	2					20,7		2		2	
455/04	Sta Casa		13	27	1	1		8,40	2							2		2	
230/04	Sta Casa		18	20	2	1	1	12,60	2					26,1		2		2	
586/03	Sta Casa	238394	5	10	2	1	2	10,20						17,6		2	1		
958/03	Sta Casa	307577	7	11	2	2		9,10	2					20,8		2	1		
352/04	Sta Casa	89296	8	11	2	1	2	10,95						28,6		2	1		
2249/04	Sta Casa	107088	2	19	1	1	2	9,20						27,4		2		2	
617/04	Sta Casa		9	15	2	2	1	8,30						19,8		2		2	
151/04	Sta Casa		17	18	2	1	2	11,30	2							2	1		
212/04	Sta Casa		4	18	2	1	2	8,40	2					26,0		2	1		
82/04	Sta Casa		2	10	2	1	2	11,10	2					19,9		2	1		
1229/04	Sta Casa	539943	7	10	2	1	2	8,10	2					23,9		2	1		
460/04	Sta Casa	51974	1	13	2	2	2	10,20	2					20,6		2		2	
283/04	Sta Casa		15	22	2	1	2	8,70	1					20,3		2	1		
1329/03	Sta Casa	277650	10	10	2	1	2	13,50	2					21,8		2	1		
706/03	Sta Casa	469058	2	17	2	2	2	11,60	2					21,2		2			
2119/04	Sta Casa		3	16	2	1	2		2							2		2	
2625/04	Sta Casa	209661	6	11	2	1	2	8,20	2					25,1		2	1		
1300/04	Sta Casa		10	11	2	1	2	12,80	2					24,1		2	1		
1190/03	Sta Casa	224096	1	16	2	1	2	8,90	2					24,0		2	1		
902/04	Sta Casa	582458	8	11	2	2	2	11,00	2					19,1		2		2	
2358/04	Sta Casa	250177	4	10	2	1	2	11,00	2					25,2		2		2	

1694/03	Sta Casa	44855	6	15	2	1	2	8,60	2					24,5		2	1		
766/04	Sta Casa	756286	3	17	1	1	2	9,50	1					21,3		2		2	
2179/04	Unicamp	371467-2	12	11	2	1	2		2					28,7		2		2	
2133/04	Unicamp	614403-6	6	30	2	2			2							2		2	
2423/04	Unicamp	641820-1			2	1	2		2							2			
2180/04	Unicamp	577097-3	14	10	2	1	2		2					21,3		2		2	
0012/05	Unicamp	454334-3	28	28	2	1	2		2							2			
0850/04	Unicamp	301919-9	13	30	2	1			1							2		2	
0787/04	Unicamp	665927-9			2	1	2		2							2		2	
0788/04	Unicamp	373190-5	22	14	2	1	2	8,50	2	130,00	79,20	40,50	124,00	26,1		2		2	
0752/04	Unicamp	326146-5	29	14	2	2		7,00	2	142,00	35,00	98,00	51,00	24,1		2		2	3?
2176/04	Unicamp	831263-7	12	11	2	2			2							2		2	
0750/04	Unicamp	535047-2			2	1			2					21,9		2		2	
2134/04	Unicamp	737048-8			2	1	2		2							2			
2177/04	Unicamp	881134-0	6	20	2	1			2							2		2	
0895/04	Unicamp	084016-1	13	21	2	1	1	9,70	2	162,30	61,00	88,60	106,30			2	1		
1559/04	Unicamp	163496-1	8	21	2	1	2		2							2		2	
2242/04	Unicamp	236074-5			2	2			2							2		2	
1052/04	Unicamp	450096-5	8	18	2	1	2	8,30	1	213,00	45,00	138,00	131,00	24,8		2		2	
1558/04	Unicamp	810798-9	10	17	1	1	2	10,20	1	212,00	73,30	126,00	78,30			2			
0853/04	Unicamp	861729-5	15	14	1	2		7,95	2	163,00	41,00	111,00	107,00	22,0		2		2	
1561/04	Unicamp	594878-0	14	21	2	1		12,70	1	166,00	51,50	109,00	64,50			2	1		
1051/04	Unicamp	595301-4	35	13	2	1			2					29,7		2		2	
2381/04	Unicamp	834435-3			2	1	2		2							2		2	
0785/04	Unicamp	814936-1			2	2			1							2		2	
0789/04	Unicamp	037169-5	15	26	2	2		7,80	2	163,30	38,30	105,00	108,00	23,6		2		2	
0753/04	Unicamp	301156-9	11	18	1	2	2		1					25,5		2		2	
0784/04	Unicamp	814169-0	19	23	1	2			1							2			
2130/04	Unicamp	657473-4	8	10	2	1	2		2					30,4		2		2	
0855/04	Unicamp	611060-9	14	11	2	1	2	8,32	2	145,00	45,00	82,00	105,50	31,4		2		2	
2243/04	Unicamp	322173-0			2	1	2		1							2		2	
1560/04	Unicamp	594295-2	11	33	1	2		7,48	1	144,00	35,60	95,30	95,60			2		2	
2125/04	Unicamp	401263-7			2	1			2							2		2	
2022/04	Unicamp	763778-1	29	44	2	1	2	11,30	1	186,50	73,30	101,80	71,00	24,2		2		2	

0856/04	Unicamp	872096-1	28	16	1	1	2	10,80	2					23,8		2		2	
0755/04	Unicamp	468931-3	8	13	2	2	2		2							2		2	
2383/04	Unicamp	385055-1			2	1	1		2							2		2	
2132/04	Unicamp	071199-0	18	17	1	1			1							2		2	
0896/04	Unicamp	855434-4	10	25	2	1		9,70	2	248,50	66,00	164,50	124,00			2	1		
2380/04	Unicamp	125535-5	14	32	2	1	2		2					30,0		2		2	
0786/04	Unicamp	372976-0	33	18	2	1	2	10,60	2	228,50	42,00	135,00	168,00	29,2		2	1		
0013/05	Unicamp	551419-7	18	23	2	1	2		2							2		2	
2135/04	Unicamp	334286-5			1	1			1							2		2	
0484/05	Unicamp	639688-9	13	29	2	2			1							2		2	
2178/04	Unicamp	529805-2			2	1			2							2		2	
0749/04	Unicamp	047580-1			1	2	2	7,20	1	172,00	55,00	106,00	61,00	21,5		2			
0751/04	Unicamp	824254-9			2	2			1							2		2	
0854/04	Unicamp	434043-0	29	20	2	1		7,30	2	197,00	58,00	123,50	78,60	25,6		2	1		
0894/04	Unicamp	779777-7	14	28	1	2	1		1	183,00	40,60	104,00	215,00			2		2	
2131/04	Unicamp	091864-3	14	11	2	1			2							2		2	
2241/04	Unicamp	153411-3			2	1	2		2							2		2	
0849/04	Unicamp	498594-5	10	17	1	2	2	11,60	1	229,80	33,40	140,40	291,40	29,8		2		2	
0898/04	Unicamp	406027-6	5	20	1	2	2	9,90	2	209,00	56,00	131,00	175,00			2		2	
1562/04	Unicamp	793162-0	15	16	1	1	2	8,80	1	200,00	62,00	126,00	92,50			2		2	
0851/04	Unicamp	274193-5	18	16	2	1		8,62	2	152,40	61,20	122,60	48,00	33,8		2	1		
2382/04	Unicamp	763553-9			2	1			2							2		2	
0482/05	Unicamp	249801-5	12	36	2	2	1		1							2		2	
2314/04	Unicamp	475700-9	17	14	2	1			1					25,3		2	1		
0011/05	Unicamp	482955-3	28	10	2	1			1							2			
2021/04	Unicamp	449331-8	9	13	2	1		6,50	2	130,50	52,50	71,50	41,00	21,8		2		2	
2313/04	Unicamp	187048-4			2	1	2		2							2		2	
0754/04	Unicamp	207689-9			1	2	2		2							2		2	
0483/05	Unicamp	411815-4	4	20	1	2			1							2			
2023/04	Unicamp	751068-2	8	20	1	2	2	6,30	1	162,00	34,50	110,80	103,80	22,0		2		2	
0897/04	Unicamp	838645-8	9	18	2	1	2	6,50	2							2	1		
0852/04	Unicamp				2	2	2	8,40		211,00	52,00	144,20	74,00			2		2	
				45	127														