

FLAVIO RICHETI

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS AC(n) e C-106T DO GENE DA
ALDOSE REDUTASE EM PACIENTES COM *DIABETES MELLITUS*
TIPO 1 E SUSCETIBILIDADE À RETINOPATIA DIABÉTICA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

São Paulo

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FLAVIO RICHETI

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS AC(n) e C-106T DO GENE DA
ALDOSE REDUTASE EM PACIENTES COM *DIABETES MELLITUS*
TIPO 1 E SUSCETIBILIDADE À RETINOPATIA DIABÉTICA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mônica Barbosa de Melo

São Paulo

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Richeti, Flavio

Avaliação dos polimorfismos AC(n) e C-106T do gene da aldose redutase em pacientes com *diabetes mellitus tipo 1* e suscetibilidade à retinopatia diabética./ Flavio Richeti. São Paulo, 2006.

Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de pós-graduação em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Mônica Barbosa de Melo

1. Diabetes mellitus tipo 1 2. Retinopatia diabética 3. Aldeído redutase 4. Polimorfismo (Genética) 5. Técnicas de diagnóstico molecular

BC-FCMSCSP/50-2006

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

A minha esposa Danielle pelo incentivo, companheirismo e auxílio nas horas mais difíceis do percurso.

Aos meus pais Fernando "in memoriam" e Olimpia, pela formação do meu caráter, amor, auxílio e confiança, "Saudades PAI".

Aos meus irmãos: Fernando Jr., Fabio e Francine, e cunhados: Paula, Luciana e Célio, pela amizade e admiração mútuas.

Aos meus avós, primos e primas, tios e tias e em especial a tia Cidinha, decisiva para meu ingresso à área de Ciências Biológicas.

E a todos aqueles que, desde os momentos mais difíceis e complexos, auxiliaram direta ou indiretamente na realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Osmar Monte, Diretor do Departamento de Ciências Fisiológicas da FCMSCSP, pela confiança e oportunidade de concretizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Raul Cisternas Gajardo, pelo interesse e incentivo.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Longui, pela oportunidade, confiança e compreensão nos momentos difíceis e exemplo de dedicação ao trabalho.

Aos Professores Murilo Rezende de Melo, Prof. Dra Cristiane Kochi e Dra Claudia Dutra Constantin Faria, pelo suporte em todos os momentos de dúvida e necessidade.

Ao Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos, pela supervisão direta e indireta.

A Mylene Neves Rocha, pelo imenso apoio, auxílio, palavras amigas e cumplicidade, em coisas que só um pós graduando pode sentir durante esta jornada.

Aos Professores da Banca de Exame de Qualificação, Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes, Profa. Dra. Regina Santiago Moisés e Profa. Dra. Cristiane Kochi, pelas sugestões e críticas de tamanha importância para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Rita de Cássia Santos Oliveira, Sadia Mustafá e Aparecida Sueli Orlandeli Longui, pelo apoio e orientações.

Ao fundo de Amparo a Pesquisa (FAP) da Fundação Arnaldo Vieira de Carvalho da FCMSCSP, pelo apoio financeiro.

A Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP), a Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e a Fundação Arnaldo Vieira de Carvalho, pela oportunidade de realizar este trabalho.

A todos os pacientes que, voluntariamente, cederam suas esperanças em busca de algo melhor para todos.

E meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, colaboraram para a idealização deste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço de forma especial a Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo, pela total dedicação e entrega nos momentos de necessidade, paciência nos momentos de insegurança, compreensão nos momentos mais difíceis de minha vida, e principalmente a alegria que este momento tão nobre proporciona na vida de qualquer pessoa.

Muito Obrigado.

SEMPRE

Às vezes não temos palavras,

Mas temos pensamentos.

Às vezes não temos atitudes,

Mas temos expressões.

Às vezes não temos o cativo,

Mas temos o mundo sob nosso olhar,

Sob nossas retóricas,

Sob o caos,

Todos nós,

A Ciência.

F.R.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 – REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1.1 - Diabetes Mellitus	3
<i>Definição</i>	3
<i>Histórico</i>	3
<i>Classificação</i>	4
<i>Manifestações clínicas, diagnóstico e complicações</i>	5
1.1.2 - Retina	6
<i>Estrutura e função</i>	6
1.1.3 - Retinopatia Diabética	7
<i>Classificação</i>	8
<i>Patogênese</i>	9
1.1.4 - Fatores de risco para o desenvolvimento de retinopatia diabética	12
<i>Fatores diretamente relacionados à retinopatia diabética</i>	12
<i>Duração do DM</i>	12
<i>Controle glicêmico</i>	13
<i>Nefropatia diabética</i>	13
<i>Fatores não diretamente relacionados</i>	14
<i>Hipertensão arterial sistêmica</i>	14
<i>Fatores ambientais</i>	14
1.1.5 - Fatores genéticos envolvidos na etiologia da RD	15
<i>Aldose redutase</i>	16
<i>O gene codificador da aldose redutase: ALR2</i>	19
2 - OBJETIVOS	29
3 – CASUÍSTICA E MÉTODOS	31
3.1 - Pacientes	31
3.2 - Exame Fundoscópico	31
3.3 - Extração de DNA de sangue periférico	32
3.4 – Análise do polimorfismo (AC)n	32
3.4.1 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	32
3.4.2 - Análise de fragmentos	33
3.4.3 - Seqüenciamento automático	33
3.5 - Análise do polimorfismo C(-106)T	35
3.5.1 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	35
3.5.2 – Digestão Enzimática	36
3.6 - Análise Estatística	36
4 - RESULTADOS	39
4.1 – Análise descritiva	39

5 – DISCUSSÃO	53
6 – CONCLUSÕES	61
7 - ANEXOS	63
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

(AC)_n	Repetição dos dinucleotídeos adenina e citosina, referente ao polimorfismo localizado no promotor do gene da aldose redutase, 2,1 Kb à montante do início da região codificadora
ADA	“American Diabetes Association”
AGEs	“Advanced Glycation End Products” ou Produtos finais de glicação avançada
ALR2	Gene codificador da enzima aldose redutase
AR	Aldose Redutase
<i>BfaI</i>	<i>Bacterioides fragilis</i>
BHR	Barreira Hemato Retiniana
C(-106)T	Polimorfismo de citosina para timina, localizado 106 nucleotídeos à montante do início da região codificadora
DAG	Diacilglicerol
DCCT	“Diabetes Control and Complication Trial”
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
DMID	<i>Diabetes Mellitus</i> Insulino Dependente
DMNID	<i>Diabetes Mellitus</i> Não Insulino Dependente
ETDRS	“Early Treatment Diabetic Retinopathy Study”
FGF	“Fibroblasts Growth Factor” ou Fator de crescimento dos fibroblastos
FO	Exame oftalmoscópico de Fundo de Olho
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HbA_{1c}	Hemoglobina Glicada

IGF-1	“Insulin Like Growth Factor” ou Fator de crescimento “ <i>insulina like</i> ”
Kb	Kilobases
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo "forma reduzida"
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato "forma reduzida"
NO	“Nitric Oxid” ou Óxido Nítrico
ORE	“Osmotic Response Element”
PCR	“Polymerase Chain Reaction” ou Reação de polimerização em cadeia
PDGF	“Platelet Derived Growth Factor” ou Fator de crescimento derivado das plaquetas
PKC	“Protein Kinase C” ou Proteína Quinase C
RD	Retinopatia Diabética
RDNP	Retinopatia Diabética Não Proliferativa
RDNPL	Retinopatia Diabética Não Proliferativa Leve
RDNPM	Retinopatia Diabética Não Proliferativa Moderada
RDNPG	Retinopatia Diabética Não Proliferativa Grave
RDP	Retinopatia Diabética Proliferativa
ROS	“Reactive Oxygen Species” ou Espécies reativas ao oxigênio
SORD	Sorbitol Desidrogenase
TonE	“Osmotic Response Element of the Canine Betaine Transporter Gene” ou Elemento responsivo do gene transportador de betaína canina
VEGF	“Vascular Endothelial Growth Factor” ou Fator de crescimento endotelial vascular
WESDR	“Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy”
Z	Alelo mais comumente encontrado no polimorfismo AC(n), localizado no promotor do gene ALR2, contendo 24 repetições AC

ZIMC

Pontuação Z do índice de massa corporal

1 - INTRODUÇÃO

Dentre as principais complicações resultantes do aumento da glicemia em pacientes diabéticos encontra-se o surgimento de neovasos em tecidos específicos. Os tecidos mais comumente afetados pela hiperglicemia são a retina, os nervos e os rins, tendo como definição patológica, respectivamente, retinopatia diabética, neuropatia diabética e nefropatia diabética.

Denomina-se Retinopatia Diabética (RD) o conjunto de alterações retinianas e vítreas causadas pelo diabetes. No Brasil, estima-se que metade dos portadores de Diabetes Mellitus (DM) seja afetada pela RD, sendo esta responsável por 7,5% das causas de incapacidade de adultos para o trabalho e por 4,6% das deficiências visuais.

Vários mecanismos bioquímicos têm sido propostos para explicar anormalidades estruturais e funcionais associadas à exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia, tais como: 1) Formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), 2) Aumento da atividade da aldose redutase (AR), levando a alterações decorrentes do aumento do sorbitol e redução de mio-inositol; 3) Acúmulo de radicais livres e estado de oxidação, culminando com o chamado estresse oxidativo (ROS) e 4) Ativação da proteína-quinase C (PKC) via acúmulo de diacilglicerol (DAG).

Apesar do tempo do DM e do controle glicêmico inadequado serem importantes fatores de risco para o desenvolvimento da RD, cada vez mais é reconhecido o envolvimento de fatores genéticos na etiologia da doença. Uma das vias bioquímicas exploradas por diversos grupos é a via da aldose redutase ou via dos polióis. Esta enzima é codificada pelo gene ALR2, cuja expressão tem-se demonstrado aumentada em indivíduos com retinopatia diabética. Dois polimorfismos, AC(n) e C(-106)T, localizados no promotor do gene ALR2, foram descritos e seu papel na suscetibilidade e/ou proteção ao desenvolvimento da retinopatia diabética vem sendo abordado em diferentes populações, sugerindo que estas alterações possam agir como marcadores para o desenvolvimento da doença.

1.1 – REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 - Diabetes Mellitus

Definição

O *Diabetes Mellitus* (DM) caracteriza-se pela elevação anormal da concentração de glicose no sangue. Em indivíduos normoglicêmicos, quando esta aumenta, em virtude da alimentação, ocorre a secreção de insulina pelo pâncreas. A insulina estimula, de modo geral, a captação desta glicose do sangue pelas células, fazendo com que sua concentração decresça até a considerada normal. Nas pessoas com DM, esta concentração se mantém elevada. O que ocorre em função de uma deficiência parcial ou total da produção de insulina pelo pâncreas ou pelos fatores de resistência à insulina e obesidade (CALLIARI, 1998).

Histórico

Os efeitos do DM têm sido observados por profissionais há centenas de anos. Por muito tempo, as informações sobre esta doença fatal que causava perda de peso, sede e freqüente micção, eram modestas.

Por volta de 250 AC o termo “*Diabetes*” foi usado pela primeira vez. É uma palavra grega que significa sifão, demonstrando como o diabetes parecia drenar rapidamente o fluido do indivíduo afetado. O médico grego Aretaeus verificou que quando os indivíduos afetados enfraqueciam, eles passavam a produzir grandes quantidades de urina como se “suas carnes e ossos se liquefizessem em urina”. O termo completo *Diabetes Mellitus* foi utilizado em 1674, por Thomas Willis, médico pessoal do rei Charles II. *Mellitus* em latim significa mel, que é como Willis descrevia a urina dos diabéticos (“como se embebida de açúcar e mel”).

No ano de 1889 os médicos alemães Joseph Von Mering e Oskar Minkowski removeram cirurgicamente o pâncreas de cães e estes, imediatamente, desenvolveram o diabetes, estabelecendo-se a correlação entre a doença e o órgão. Criaram-se grandes

expectativas investigativas em relação à purificação de um extrato pancreático que poderia tratar o diabetes, fato que se tornou realidade somente em 1921 com Frederick Banting, sob supervisão do professor John Macloed em Toronto, Canadá, assistido por Charles Best, estudante de medicina. Subseqüentemente, a pureza deste extrato foi aprimorada pelos médicos J. Collip e por Best, até que em janeiro de 1922 o primeiro paciente recebeu tratamento com insulina.

Durante a primavera de 1922, Best aumentou a produção de insulina para possibilitar o tratamento de pacientes diabéticos que iam para as clínicas de Toronto. Em 1923, Banting e Macloed ganharam o prêmio Nobel pela descoberta da insulina. Banting dividiu seu prêmio com Best e Macloed com Collip (DEAN & MCENTYRE, 2004).

Classificação

O DM tipo 1, anteriormente denominado DM insulino-dependente (DMID), é causado pela falta de secreção de insulina devido a uma disfunção do sistema imunológico levando à lesão das células beta do pâncreas. Seu desenvolvimento é mais comum na faixa etária pediátrica e na adolescência e o mecanismo de lesão tecidual, apesar de não ser claro, resulta na ausência da produção de insulina (GUYTON & HALL, 2002). Sua prevalência dentre os diabéticos varia de 10 a 15% [American Diabetes Association (ADA), 2002].

O DM tipo 2, previamente denominado DM não insulino dependente (DMNID) é causado pela redução da sensibilidade dos tecidos-alvo ao efeito da insulina, condição descrita como resistência à insulina e também pela queda na produção de insulina pelas células beta do pâncreas. É mais freqüente em adultos, podendo aparecer na adolescência, associado à obesidade (GUYTON & HALL, 2002). Sua prevalência dentre os diabéticos varia de 85 a 90% (ADA, 2002).

Manifestações clínicas, diagnóstico e complicações.

As manifestações clínicas nos critérios para o diagnóstico do DM, segundo a ADA em 2004, foram estabelecidos exclusivamente pela detecção de hiperglicemia (aumento da concentração de glicose no plasma). Em 2004 o critério de diagnóstico para diabetes foi modificado para melhor diagnóstico de indivíduos com retinopatia e nefropatia. Os critérios passaram a ser:

- a) Sintomas de diabetes e glicose plasmática casual igual ou superior a 200 mg/dL;
- b) Glicose plasmática em jejum $\geq$ a 126 mg/dL;
- c) Glicose 2 horas pós dextrosol $\geq$ a 200 mg/dL:

Se um destes três critérios for atendido, faz-se necessário repetir os testes em dia subsequente, para que o diagnóstico seja estabelecido. A ADA propõe que a glicose em jejum deva ser medida em todas as pessoas assintomáticas com idade igual ou superior a 45 anos. Se o resultado for inferior a 100 mg/dL, o teste deve ser repetido num intervalo de 3 anos. O controle dos níveis de glicose no plasma apresenta uma relação direta com o risco de complicações renais, oculares e neurológicas. Pessoas com DM 1 que mantêm baixas concentrações plasmáticas de glicose exibem incidência significativamente reduzida dessas complicações. Similarmente, estes resultados são observados em DM 2. Devido ao aumento da prevalência de Diabetes tipo 2 em crianças, a triagem tem sido atualmente sugerida nas acima de 10 anos, sendo que os testes devem ser realizados a cada 2 anos em indivíduos com "sobrepeso" e obesidade que apresentem 2 dos seguintes fatores de risco: história familiar, cor da pele e resistência à insulina.

Os resultados do “DIABETES CONTROL AND COMPLICATION TRIAL (DCCT) 1993” comprovaram que a hiperglicemia crônica é o fator causal mais importante para o

desenvolvimento da microangiopatia, que acomete em particular os rins e os olhos (ALDER et al, 1997; DAMICO 1994). A Retinopatia Diabética (RD) é a complicação vascular mais específica, tanto do *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) quanto do *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) e quando evolui para cegueira é considerada uma das complicações mais graves (FERRIS 1993; KLEIN et al, 1994; ROSENBLATT & BENSON, 2004).

Além da RD, as complicações mais importantes resultantes da presença do DM são: nefropatia diabética, neuropatia diabética, pé diabético, infarto do miocárdio, acidentes vasculares e infecções. Em suma, essas complicações envolvem o sistema cardiovascular, sistema nervoso, derme, ossos, rins e olhos (MASHARANI & KARAM, 2001).

1.1.2 - Retina

Estrutura e função

A retina é uma das regiões onde ocorrem as alterações microvasculares resultantes do DM (YANOFF, 1966). Os vasos da retina e o epitélio pigmentar formam a chamada “barreira hemato-retiniana” (BHR), uma forte barreira contra macromoléculas, fazendo da retina um tecido imunologicamente privilegiado e propiciando um mecanismo de controle do fluxo de fluidos e metabólitos (HEEGAND, 1997; SCHRODER et al, 1990). Os capilares retinianos são tubos cilíndricos, revestidos por endotélio, não circundados por músculo liso e portadores de um mínimo de tecido conjuntivo. Estes capilares são revestidos por uma membrana basal que ancora suas células endoteliais à matriz intersticial adjacente (CORMACK, 1996). O endotélio dos capilares é rodeado, em intervalos irregulares, por células murais chamadas de pericitos. Há controvérsias sobre o papel dos pericitos como reguladores do fluxo sanguíneo dos capilares, pós-capilares e vênulas, mas a presença de actina, miosina e tropomiosina sugerem uma capacidade contráctil dos mesmos (IMESCH et al, 1997; HIRSCHI et al, 1997). Os vasos da retina de humanos e animais são caracterizados por células endoteliais contínuas,

não fenestradas, com junções intercelulares impermeáveis, que se apresentam para formar a BHR. A interação entre as células endoteliais forma a barreira que permite ao tecido, assim como ao endotélio capilar e ao epitélio pigmentar da retina, criarem condições para um tecido com integridade funcional. A junção intercelular representa um pequeno poro (9 a 11 nm) que é responsável pelas trocas transcapilares de água e outras moléculas hidrofílicas menores que 15 Å (BOSCO et al, 2005). Na retina, encontramos as chamadas junções intercelulares de oclusão entremeadas a desmossomos, as quais, no DM, encontram-se freqüentemente rompidas. Com a quebra destas junções caracterizamos a quebra da BHR e conseqüentemente o desenvolvimento da RD (IMESCH et al, 1997; ISHIBASHI et al, 1993).

1.1.3 - Retinopatia Diabética

Denomina-se Retinopatia Diabética (RD) o conjunto de alterações retinianas e vítreas causadas pelo diabetes. No Brasil, estima-se que metade dos portadores de DM seja afetada pela RD, sendo esta responsável por 7,5% das causas de incapacidade de adultos para o trabalho (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003) e por 4,8% das deficiências visuais (RESNIKOFF et al, 2004). A proporção de pacientes com RD aumenta progressivamente com a duração do DM “Early Treatment Diabetic Retinopathy Study” (ETDRS 1991), sendo que a maioria dos pacientes, em especial os com DM tipo 1, apresentarão algum grau de RD após cerca de 20 anos de duração da doença (KENN et al, 2001; KLEIN et al, 1984; KROLEWSKI et al, 1986).

A incidência de RD proliferativa é aproximadamente o dobro em pacientes com DM tipo 1 (MIKI et al, 2001). Esta diferença na incidência de RD proliferativa e outros estágios de RD nos diabéticos dos tipos 1 e 2, sugerem a existência de mecanismos patogênicos e fatores de risco próprios para a forma proliferativa da doença (BOELTER et al, 2003).

Classificação

O “Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT)”, em 1993, subdividiu a retinopatia em dois estágios: não proliferativa (RDNP) e proliferativa (RDP).

A Retinopatia Diabética não proliferativa é subdividida em leve (RDNPL), moderada (RDNPM) e grave (RDNPG). A forma leve caracteriza-se apenas pela presença de microaneurismas. A forma moderada apresenta, além de microaneurismas, exsudatos moles e duros e/ou hemorragias retinianas associadas a anomalias microvasculares intraretinianas restritas a um quadrante. Já na forma grave, não há sinais de retinopatia diabética proliferativa, porém as seguintes características podem ser observadas: > 20 pontos de hemorragia em cada um dos quatro quadrantes do olho, vasos em forma de rosário e hemorragias retinianas associadas a anomalias microvasculares intraretinianas em pelo menos dois quadrantes (WILKINSON et al, 2003).

A Retinopatia Diabética Proliferativa (RDP) caracteriza-se pela presença de vasos neoformados e tecido fibroso proveniente da retina e do disco óptico, o qual se estende para a superfície interna ou para dentro da cavidade do vítreo. Os vasos neoformados se desenvolvem a partir dos vasos da retina, sendo no início finos e, posteriormente, com o crescimento, calibrosos, formando redes de neovasos. A natureza frágil desses neovasos faz com que o risco de hemorragia do vítreo seja comum, podendo causar perda visual aguda (DIB, 1998).

No início do desenvolvimento da RDNP, são observados microaneurismas precoces, os quais, à medida que evoluem, aparecem sob forma de pontos vermelhos ao exame fundoscópico. Estes microaneurismas são dilatações saculares que, em função da perda dos pericitos (acúmulo de sorbitol), apresentam sua parede mais frágil e suceptível às dilatações. Além disso, a perda dos pericitos faz com que haja quebra da barreira hemato-retiniana e extravasamento do soro do vaso para o espaço intercelular (edema). Com o edema, há

acúmulo de lipídeos e proteínas formando os chamados exudatos duros. Assim, podemos ter exudatos duros sem hemorragia. Os microaneurismas podem se romper, gerando hemorragias intrarretinianas profundas (camada plexiforme externa e nuclear externa). Visto que também ocorrem alterações hematológicas (aumento da viscosidade sanguínea, diminuição da deformabilidade das hemácias) e anatômicas (perda de pericitos e espessamento da membrana basal capilar), existe a tendência de desenvolvimento de micro-oclusões (micro-infartos) do leito capilar. Isto gera áreas de não perfusão e isquemia. As micro-oclusões se traduzem fundoscopicamente nos exudatos moles (necrose da camada de fibras nervosas). A isquemia progressiva ativa os polipeptídeos responsáveis pela proliferação vascular, a qual, na RD, tem como principais fatores o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (PINHEIRO, 2001).

Patogênese

No DM, encontramos perda dos pericitos, tornando os vasos acelulares ou fantasmas (IMESCH et al,1997; HIRSCHI et al, 1997) e a ruptura da BHR, o que caracteriza várias complicações, como por exemplo, edema macular. Além disso, a perda dos pericitos precede a neovascularização que pode levar à cegueira (HIRSCHI et al,1997; POLAK et al, 1997). Nos capilares retinianos dos pacientes com DM, sob a luz da microscopia eletrônica, podemos observar inúmeros capilares com as junções interendoteliais abertas, aumento da vacuolização citoplasmática, pericitos com alterações degenerativas e espessamento da membrana basal do capilar, que ocorre somente, e de forma precoce, no DM e que é muito reproduzido em estudos experimentais (POLAK et al, 1997). Este espessamento, cuja causa ainda é desconhecida, (POLAK et al,1997; TSILIBARY, 2003) altera a função celular e/ou a difusão de oxigênio e reduz o contato entre os pericitos e a célula endotelial, contribuindo para alterações vasculares nos diabéticos. Ocasionalmente, podemos também observar tanto nos

capilares quanto nas vênulas da retina um filamento focal do citoplasma, formando fenestras. Os vasos retinianos de indivíduos normais apresentam conexões intercelulares compactas e não contêm células endoteliais fenestradas (IMESCH et al, 1997; ISHIBASHI et al, 1993).

Vários mecanismos bioquímicos têm sido propostos para explicar anormalidades estruturais e funcionais associadas com a exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia, tais como: 1) Formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), 2) Aumento da atividade da aldose redutase (AR), levando a alterações decorrentes do aumento do sorbitol e redução de mio-inositol; 3) Acúmulo de radicais livres e estado de oxidação “espécies reativas de oxigênio” (ROS) culminando com o chamado estresse oxidativo e; 4) Ativação da proteína-quinase C (PKC) via acúmulo de diacilglicerol (DAG) (KOYA & KING, 1998) (Fig. 1).

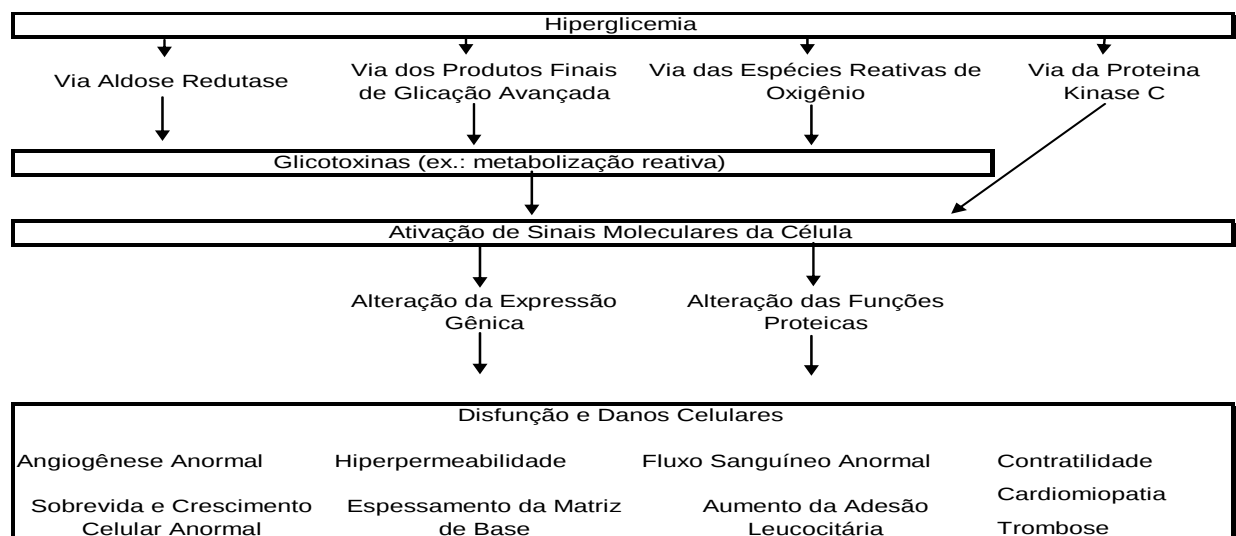


FIGURA 1: Correlação das quatro vias bioquímicas relacionadas a anormalidades estruturais das células sob condições hiperglicêmicas (Modificada de Matthew & George, 2002).

Não há uma hipótese que unifique estes quatro mecanismos, mas tanto alterações de oxi-redução causadas pelo aumento do fluxo da via do sorbitol como o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio, ROS, induzido pela hiperglicemia podem ser responsáveis por todas as outras alterações bioquímicas. O aumento do ROS também pode reduzir os níveis de óxido nítrico (NO) e, conseqüentemente, ativar a aldose redutase. O aumento do fluxo pela

via dos polióis, induzido pelo aumento do ROS determina uma maior conversão de glicose em sorbitol, que acarreta, concomitantemente, a redução de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e glutatona, aumentando o estresse oxidativo induzido pela glicemia. O sorbitol é convertido em frutose, resultando no aumento da relação nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH): NAD⁺, o que aumentaria a síntese *de novo* de DAG e daí a ativação da PKC. Por fim a produção de produtos finais de glicação avançada (AGEs), induzida pela hiperglicemia crônica do DM, além de causar dano tecidual direto, particularmente nos pericitos, também pode aumentar a formação de ROS (BROWNLEE, 2001). O aumento da glicose intracelular é então o principal determinante do dano tecidual causado pelo DM, dano este que vem a ser reversível quando restaurada a condição normoglicêmica, ou irreversível mesmo quando revertida a hiperglicemia, pois este se originou a partir de alterações cumulativas em macro-moléculas de vida longa (NISHIKAWA et al, 2000).

De maneira geral, todas estas vias, direta ou indiretamente, estão associadas à produção e sinalização do VEGF (BOSCO et al, 2005), o qual é o mais potente agente permeabilizante e, aparentemente, o mais relacionado com o surgimento de neovasos na RD. O VEGF é conhecido por induzir hiperpermeabilidade em microvasos ou quebra da barreira hemato-retiniana, que é a alteração funcional mais precocemente observada na RDNP. A sua produção é aumentada pela isquemia e a neovascularização é quase sempre associada com hipoperfusão ou ausência de perfusão capilar. O número de receptores para VEGF nas células endoteliais da retina é substancialmente maior que nas células endoteliais de outros tecidos e aumenta em resposta à hipóxia, sendo eles difusíveis e solúveis em água e, devido a isso, causam neovascularização não só na retina, mas também nos tecidos oculares anteriores como íris e córnea (MURATA et al, 1996; TANAKA et al, 1997).

Outros fatores de crescimento dos neovasos estão envolvidos na RD, dentre eles o fator de crescimento *insulina like* (IGF-1), cujos receptores são encontrados nas células

endoteliais vasculares da retina. O IGF-1 parece não ter um papel direto na causa da RD, mas pode agir como um fator agravante para o crescimento de novos vasos. Além disso, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), sob as isoformas A e B, também foi detectado nas células endoteliais da retina, no epitélio pigmentar da retina e em retina *postmortem*. Finalmente, o FGF desempenha seu papel através da regulação da expressão do VEGF nas células endoteliais (AIELLO et al, 1994).

1.1.4 - Fatores de risco para o desenvolvimento de retinopatia diabética

Os fatores de risco podem ser classificados como genéticos e não genéticos. Entre os fatores não genéticos estão aqueles diretamente relacionados à presença do DM, como duração da doença, controle glicêmico e nefropatia diabética e fatores não diretamente relacionados ao DM como hipertensão arterial sistêmica e fatores ambientais.

Fatores diretamente relacionados à retinopatia diabética

Duração do DM

A duração do DM está fortemente associada com a frequência e gravidade da RD (KLEIN et al, 1998). Após 20 anos de duração do DM quase todos os pacientes com DM1 e mais de 60% dos pacientes com DM2 apresentaram algum grau de RD, sendo 20% do tipo proliferativo (ADA, 2002). Assim sendo, a duração do DM é um fator a ser levado em consideração em todos os pacientes, independentemente do controle glicêmico ou do grau de comprometimento oftalmológico (KLEIN et al, 1998)

Controle glicêmico

Com a introdução da medida de glico-hemoglobina na década de 80, que passou a ser utilizada como uma avaliação acurada do controle metabólico, foi demonstrado ser o controle da glicemia o fator de risco independente mais importante para o desenvolvimento da RD (KULLBERG et al.,1994). Na avaliação do “Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy” (WESDR) um montante de pacientes foi avaliado durante 10 anos e esta observação foi confirmada. A hemoglobina glicada (HbA1c) do diagnóstico inicial foi o mais importante fator de risco para incidência e progressão da RD (KLEIN et al.,1994). Os resultados de um estudo prospectivo que avaliou o papel do controle glicêmico na prevenção das complicações crônicas relacionadas ao DM em pacientes japoneses com DM2, confirmaram o efeito benéfico do controle glicêmico na prevenção da RD. No grupo de tratamento intensivo, tanto o aparecimento quanto a progressão da RD foram reduzidos cerca de 33% quando comparados com os pacientes sob tratamento convencional (SHICHIRI et al.,2000). Este e outros estudos demonstram de forma contundente a importância do controle glicêmico em todos os estádios da RD.

Nefropatia diabética

A nefropatia geralmente está associada à RD, sendo que ambas são patologias independentes. A nefropatia diabética acomete de 20 a 30% dos pacientes portadores de DM. O controle rígido da glicemia reduz a incidência de nefropatia e RD, o que reforça a associação entre ambas as complicações microvasculares (DCCT 1993).

Fatores não diretamente relacionados

Hipertensão arterial sistêmica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é duas vezes mais freqüente na população com DM e parece desempenhar um papel importante na patogênese da RD (LAAKSO 1999). Em pacientes portadores de DM existe hiperperfusão do leito capilar em vários tecidos (FORRESTER et al,1997). O aumento da pressão arterial aumenta a pressão intraluminal piorando o extravasamento da rede vascular e favorecendo a filtração de proteínas plasmáticas através do endotélio e sua disposição na membrana basal do capilar. Como consequência, ocorre um dano vascular e isquemia retiniana, aumentando o risco de aparecimento e progressão da RD (JANKA et al. 1989). É presumível que o aumento dos níveis pressóricos seja um fator de risco para a RD tão importante quanto o controle glicêmico: em pacientes com DM 2, para cada 10 mmHg de redução de valores de pressão sistólica ocorre uma redução de 13% nas complicações microvasculares (STRATTON et al.,2000).

Fatores ambientais

O hábito de fumar pode ter efeito deletério sobre a retina, cuja vascularização é deficiente nos portadores de DM, devido a seus efeitos isquêmicos: aumento do monóxido de carbono, aumento da agregação plaquetária e vasoconstrição. Entretanto, na maior parte dos estudos (ORCHARD et al, 1990; MOSS et al, 1991; CIGNARELLI et al, 1992), incluindo um estudo prospectivo com mais de 10 anos de seguimento (MOSS & KLEIN, 1996) o tabagismo não pareceu estar associado à RD.

O consumo de álcool pode estar relacionado ao controle glicêmico inadequado e ao aumento dos níveis pressóricos, mas não parece ser um fator de risco para a RD (MOSS et al, 1994; MOSS & KLEIN, 1996), seja para a RDP ou para a progressão da RD. Os possíveis

efeitos benéficos residiriam no incremento de HDL, redução de agregação plaquetária e dos níveis de fibrinogênio.

O WESDR avaliou a relação entre o risco de microangiopatia e atividade física. Foi estudada a história pregressa e atual da atividade física em pacientes com DM1. Em mulheres com história de atividade física atual ou na adolescência, a prevalência de RDP foi menor quando comparadas com mulheres sedentárias, o que não foi observado em homens (CRUICKSHANKS et al, 1992).

Há um consenso de que a atividade física pode ter um efeito benéfico sobre as complicações do DM. Entretanto, pacientes com RD em estágios avançados devem evitar atividades extenuantes, que envolvam choques ou golpes com a cabeça pelo risco de hemorragia vítrea ou descolamento tracional de retina (AIELLO et al 1998; ADA 2002).

1.1.5 - Fatores genéticos envolvidos na etiologia da RD

Apesar do tempo do diabetes e do controle glicêmico inadequado serem importantes fatores de risco para o desenvolvimento da RD, cada vez mais é reconhecido o envolvimento de fatores genéticos na etiologia da doença (KAO et al, 1999).

Desde o advento do projeto genoma humano, os estudos genéticos têm aumentado progressivamente. Alguns polimorfismos presentes em indivíduos portadores de RD têm sido relatados e acredita-se que cada um deles possa contribuir de alguma forma para o desenvolvimento da RD (HANIS & HALLMAN, 2006). Em função da importância que estudos relacionados a estes complexos fatores genéticos significariam em nível de saúde pública, tem se buscado estudar vários genes candidatos correlacionados com a RD. Estes genes incluem aqueles associados à glicosilação, via dos polióis, resposta imune, formação de colágeno, adesão e agregação plaquetárias (KLEIN & KLEIN, 1997). Já são conhecidas várias regiões do genoma que incluem genes, possivelmente, relacionados com a etiologia da

RD: gene *NFKB1* (4q24), gene *VEGF* (6p12), gene *ALR2* (7q35), gene *NOS4* (7q35-q36), gene *THF alfa16* (p13. 3-p12), gene *ACE1* (7q23), gene *IGF1* (12q22-q23), gene *RAGE* (14q32), gene *ICAM1* (19p13), os quais podem variar de importância de acordo com a origem étnica da população estudada (CHUNG et al, 2005; MALIC et al, 2005; DEMAINE et al, 2000; KUMARAMANICKAVEL et al, 2002; GONZALES et al 2005; STEPHENS et al, 2005; SESTI et al, 2005; YOSHIODA et al, 2005; YOKOYAMA et al, 2005).

Estudos em genes correlacionados com a via dos polióis como os da enzima sorbitol desidrogenase (SORD) (AMANO et al 2003) e aldose redutase (AR) (PETROVIC et al, 2005; SIVENIUS et al, 2004) têm ganhado em importância, sendo que a última demonstra ser uma das principais enzimas relacionada às complicações da RD (FRANK, 2005).

Aldose redutase

Papel fisiológico da AR

Os rins de mamíferos são constantemente expostos a diferentes concentrações osmóticas em virtude dos mecanismos de concentração urinária. Através do acúmulo de sorbitol, betaína, inositol, glicerol e taurina, estas células, especificamente as células epiteliais que recobrem o interior da medula renal, são protegidas do efeito osmótico causado pelo aumento na concentração de sódio e uréia, fazendo com que as mesmas mantenham íntegras sua estrutura e função em diferentes concentrações (BAGNASCO et al, 1987). O sorbitol, resultado da ação da AR sobre a glicose, atua como um contrabalanço da pressão osmótica devido ao excesso de NaCl e uréia na medula renal (BAGNASCO et al, 1986). A AR, betaína e transportadores de mioinositol e taurina, constituem um grupo de proteínas que são expressas sob condições de hipertonidade, determinadas pela rápida elevação de seus respectivos RNAm e proteínas. Nos mamíferos, outros genes somados ao ALR2 têm se

mostrado ativos na regulação da osmolaridade. No entanto, os sinais que induzem a expressão desses genes não são ainda bem estabelecidos (KO et al, 1997).

O estudo da via dos polióis ganha importância em virtude de sua alteração em condições hiperglicêmicas. A AR é a primeira enzima da via dos polióis e converte glicose em sorbitol, reação esta, dependente de NADPH. O sorbitol, subsequentemente, é convertido em frutose pela enzima SORD com o auxílio do cofator NADH. Sob condições hiperglicêmicas, há um fluxo aumentado da enzima aldose redutase e um fluxo diminuído da enzima sorbitol desidrogenase com decorrente acúmulo de sorbitol no interior das células endoteliais dos capilares retinianos (Fig 2). O fluxo de sangue no interior dos pequenos vasos sanguíneos da retina é diminuído devido ao aumento da adesão plaquetária e diminuição da plasticidade das hemácias. Estes fatos aumentam a tendência de ocorrência de oclusão capilar transformando o local em uma área sem irrigação. Sendo assim, considerando o sistema de auto-regulação do fluxo, a isquemia tecidual estimula a produção de uma substância vaso-proliferativa e fatores de crescimento que irão levar à formação de novos vasos: o VEGF e o IGF-1 (SPEICHER et al, 2003).

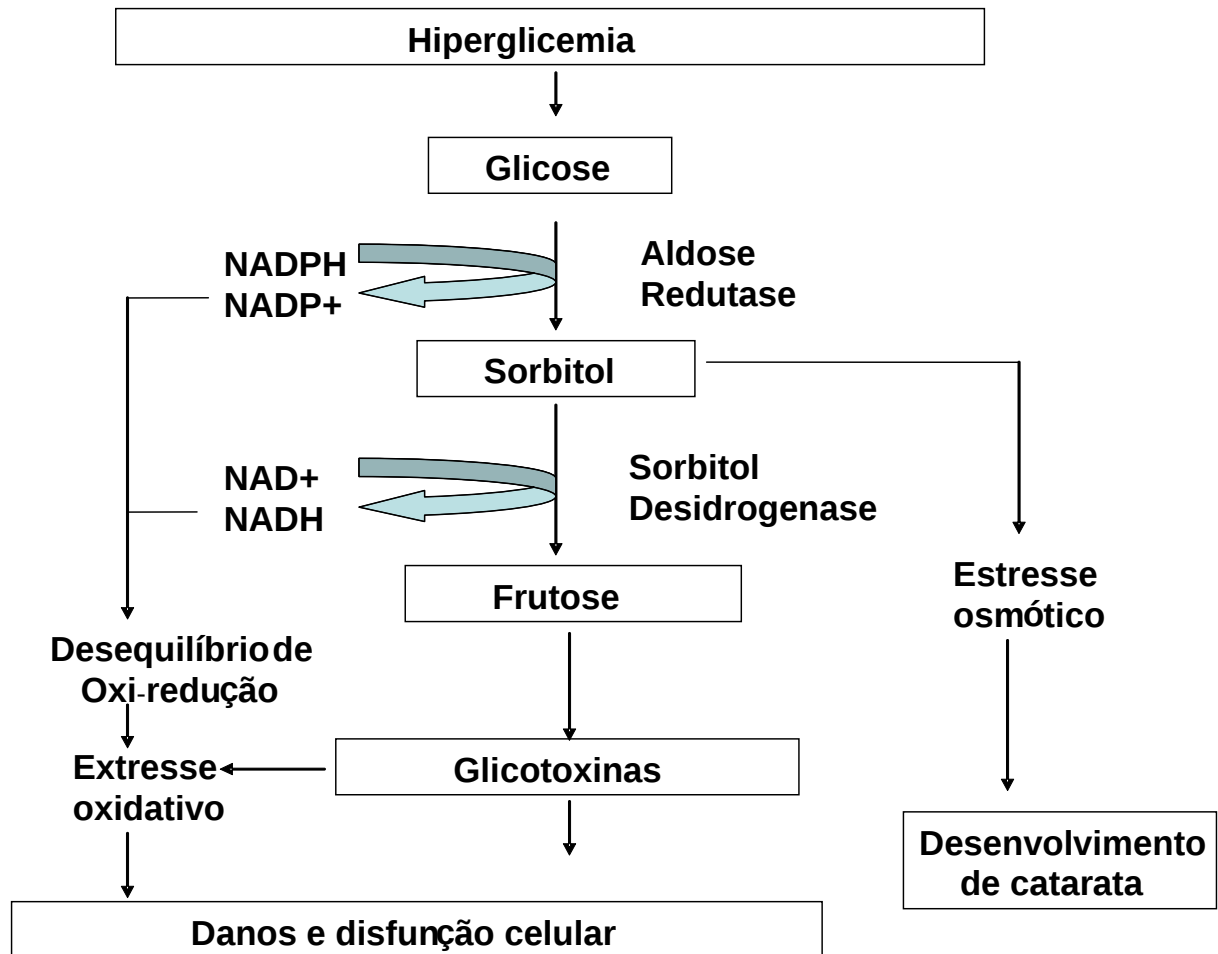


FIGURA 2. Via dos polióis. Descrição da influência da hiperglicemia na função da aldose redutase e conseqüente estresse oxidativo (Modificada de Matthew & George, 2002).

O gene codificador da aldose redutase: ALR2

A enzima aldose redutase é codificada pelo gene ALR2 (número de acesso no Genbank: U72619) cuja forma funcional consiste de 10 exons, espaçados por 18 Kb de DNA, localizado no cromossomo 7q35 (GRAHAM et al., 1991).

WANG e colaboradores, no ano de 1993, caracterizaram pela primeira vez, de maneira detalhada, o promotor do gene ALR2 humano, com a localização das seqüências consenso TATA box (-25 a -30), CCAAT box (-94 a -98), o sítio de capeamento do RNAm e o códon de iniciação ATG, além do sítio de início da transcrição, 36 pb à montante do ATG. A atividade basal do promotor do gene ALR2 humano está localizada entre -193 e +31, à montante da região de capeamento do RNAm (Fig 3).

No promotor do gene humano, também é possível observar uma seqüência semelhante à do elemento resposivo ao andrógeno, localizada de -396 a -382 (5'AGGACAAGGTATTCG). Esta seqüência também foi observada em camundongos, no promotor do gene codificador de uma proteína presente nos vasos deferentes (PAILHOUX et. al, 1992). Em humanos, a presença desta seqüência sugere o potencial do controle androgênico durante a puberdade. A AR está implicada na patogênese da RD e sabe-se que ela não ocorre em diabéticos antes do início da puberdade.(WANG et al, 1993)

A regulação transcricional da expressão gênica do gene ALR2 parece consistir de mecanismos complexos, envolvendo múltiplos fatores, que agem em *cis* e fatores em *trans*, provavelmente específicos para determinadas espécies (MCGOWAN et al, 1998).

KO e colaboradores em 1997 identificaram a região de resposta osmótica do gene ALR2 de humanos, que corresponde a 132 pb, localizada 1235 pb à montante do sítio de iniciação da transcrição do gene. Nesta região, encontram-se três seqüências do “Osmotic Response Element” (ORE), homólogas ao elemento responsivo do gene transportador de betaína canina (TonE) e ao ORE do gene da AR de coelhos (Fig 3). A resposta osmótica é

reduzida quando uma destas três seqüências é mutada, sugerindo que quando estas trabalham em conjunto, induzem o máximo de transcrição do gene. A regulação da transcrição destes genes e os mecanismos em comum pelos quais eles interagem ainda não são bem conhecidos. Contemporaneamente ao estudo de KO, FERRARIS e colaboradores no ano de 1996, estudaram a região promotora do gene ALR2 em coelhos, identificando primeiramente o ORE da AR entre os nucleotídeos -3429 e -209. Após análise detalhada de diversos fragmentos concluíram que a seqüência entre os nucleotídeos -1105 e -1094 (CGGAAAATCACC), homóloga à humana, era a menor seqüência necessária capaz de conferir resposta hiperosmótica a um gene localizado à jusante da mesma, independentemente de outros elementos em *cis*, ou seja, o mínimo ORE essencial.

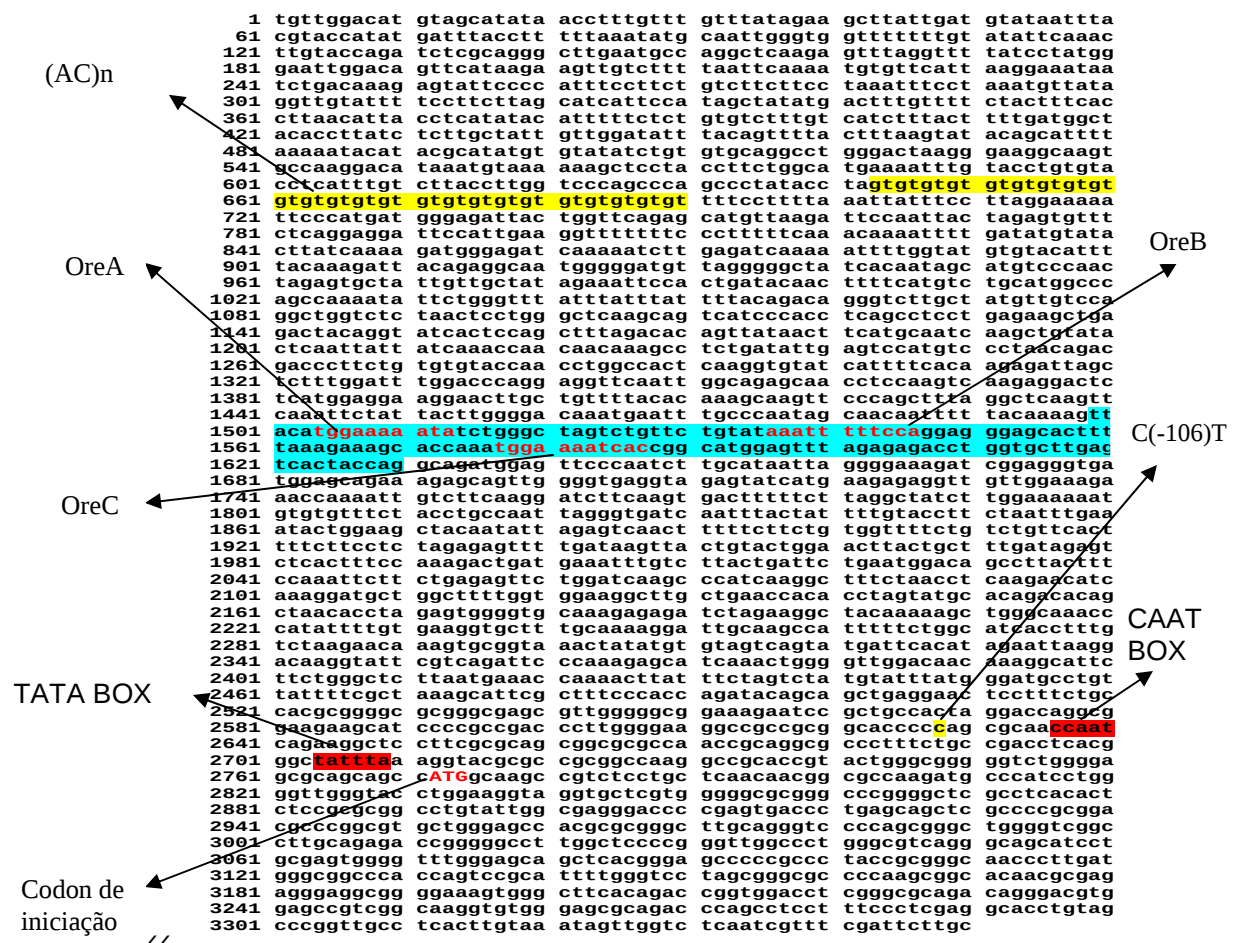


FIGURA 3: Caracterização do promotor do gene ALR2

Em vermelho: caracterização do promotor basal e do códon de iniciação.

Em amarelo: região dos polimorfismos (AC)n e C(-106)T

Em azul: fragmento de 132 pb no promotor do gene ALR2, contendo os elementos responsivos OreA, OreB e OreC.

Referências a [GRAHAM et al (1991), KO et al (1995), KAO et al (1999) e KO et al (1997)].

O gene ALR2 tem se mostrado diretamente correlacionado com as alterações na via dos polióis dos indivíduos hiperglicêmicos, em relação a sua expressão gênica. O modelo proposto da via dos polióis é fortemente fundamentado pelo fato de que na administração de inibidores de ALR2 em ratos e cães ocorre uma supressão do desenvolvimento de catarata (KINOSHITA et al, 1974; DVORNIK et al, 1973) e neuropatia diabética (WILLARS et al, 1988; MIZISIN et al, 1993). Estas espécies são geralmente usadas para estudos relacionados com a RD porque o desenvolvimento da doença nestes animais é similar aos humanos. Considerando que a administração dos inibidores de AR tenha de certa forma, diminuído os

sintomas de retinopatia nestas espécies (ROBINSON et al, 1983; ROBINSON et al, 1989; FRANK et al, 1983; KADOR et al, 1988; KADOR et al, 1990) e que também a administração de inibidores de AR em culturas de pericitos da retina bovina tenham normalizado os níveis de sorbitol destas (LI et al, 1985), é possível considerar que a expressão aumentada do gene que codifica a AR pode estar associada ao desenvolvimento da retinopatia diabética (KO et al, 1995; HEESOM et al, 1997; KAO et al, 1999).

Polimorfismo (AC)_n

Relatos de diferentes grupos sugerem o envolvimento de um polimorfismo que consiste na repetição dos dinucleotídeos AC (AC)_n, localizado 2.1Kb à montante do sítio de início da transcrição do gene ALR2, que determinaria maior suscetibilidade ao desenvolvimento de nefropatia, neuropatia e retinopatia diabética. O genótipo mais comumente encontrado com relação a esse polimorfismo é representado por 24 dinucleotídeos AC e denominado Z (KO et al, 1995; HEESOM et al, 1997; KAO et al, 1999; DEMAINE et al, 2000; PARK et al, 2002) (Figs 3 e 4).

Contudo, estudos na população coreana não relataram as mesmas evidências descritas por trabalhos anteriores. Tanto o alelo Z-2 não demonstrou um efeito de suscetibilidade à RD quanto o alelo Z+2 não demonstrou um efeito protetor (PARK et al, 2001).

Diabetes Mellitus tipo1

Em 1999, KAO e colaboradores relataram que a presença do alelo Z-2 em adolescentes brancos jovens da Austrália era condizente com o desenvolvimento de RD. No estudo com pacientes norte-americanos e do oeste europeu percebeu-se que o aumento da frequência do alelo Z-2 foi consideravelmente alto nos pacientes com RD comparado a pacientes com diabetes sem complicação a longo prazo. Além disso, relatou-se também o efeito protetor do alelo Z+2 nessas populações (DEMAINE et al, 2000).

Polimorfismo C(-106)T

Diabetes Mellitus tipo 1

Além da alteração previamente descrita, um outro polimorfismo, o C(-106)T na região promotora do gene ALR2, vinha sendo investigado por diversos grupos de pesquisa e correlacionado com a suscetibilidade ao desenvolvimento de RD (Figs 3 e 4) (KAO et al, 1999; DEMAINE et al, 2000; WANG et al, 2003; SANTOS et al, 2003). Em estudo em pacientes diabéticos com retinopatia, de origem australiana (KAO 1999) e brancos de origem norte-americana (DEMAINE et al, 2000), foi observado que o alelo C estava associado à presença de RD. Dentre os indivíduos com RD, a associação do alelo C, C(-106)T mais o alelo Z-2 (AC)_n foi a mais comum. Em contrapartida, no grupo sem complicações, tanto o alelo C quanto o alelo T estavam associados ao alelo Z+2 (AC)_n, sugerindo que o (AC)_n, juntamente com o locus C(-106)T, estariam localizados próximos à região que confere

suscetibilidade à retinopatia. Portanto, acredita-se que o haplótipo C/Z-2 poderia identificar indivíduos que apresentem níveis aumentados do RNA mensageiro do gene ALR2 e que a presença deste haplótipo levaria a um fluxo aumentado através da via dos polióis. Em contraste, os haplótipos C/Z+2 e T/Z+2 poderiam estar relacionados com uma expressão gênica reduzida. Em última instância, a expressão aumentada do gene resultaria em produção excessiva de sorbitol e frutose, anormalidades metabólicas e vasculares e estresse oxidativo na célula.

Diabetes Mellitus tipo 2

No trabalho de WANG e colaboradores em 2003, diferentemente das descobertas anteriores, associou-se a presença do alelo T aos pacientes com complicações microvasculares correlacionadas ao DM2 quando este era associado ao alelo Z-2. Em trabalho realizado por SANTOS e colaboradores (2003), estudando-se voluntários com DM2 na população euro-brasileira, não foi encontrada correlação entre o alelo C e a RD quando estudado o polimorfismo C(-106)T.

Pesquisas Realizadas Polimorfismo (AC)n/C(-106) T			
AUTOR	DM	POPULAÇÃO	POLIMORFISMO
KO et al,1995	DM2	Chinesa	(AC)n
IKEGISHI et al, 1999	DM2	Japonesa	(AC)n
ICHIKAWA et al, 1999	DM2	Japonesa	(AC)n
KAO et al, 1999	DM1	Australiana	(AC)n/C(-106)T
OLMOS et al, 2000	DM2	Chilena	(AC)n
DEMAINE et al, 2000	DM1	Norte americana e Oeste Europeu	(AC)n/C(-106)T
PARK et al, 2001	DM2	Coreana	(AC)n
WANG et al, 2003	DM2	Chinesa	(AC)n/C(-106)T
SANTOS et al,2003	DM2	Euro brasileira	C(-106)T

QUADRO 1: Descrição dos trabalhos realizados em diferentes populações com objetivo de investigar o papel dos polimorfismos (AC)n e C(-106)T na suscetibilidade ao desenvolvimento da RD.

Estudos funcionais relacionados aos polimorfismos (AC)n e C(-106)T

SHAH e colaboradores (1998) estudaram dois grupos de pacientes, o primeiro de indivíduos de origem hispânica e caucasiana e o segundo de uma população mais homogênea, de origem italiana. Segundo o autor, em ambos os grupos, observações obtidas fundamentam a hipótese de que o polimorfismo (AC)n estaria associado ao aumento da expressão do gene ALR2, apesar do mecanismo não ter sido identificado. Indiretamente a expressão de outros genes próximos do *locus* poderiam, de alguma forma, estar relacionada à expressão do gene ALR2 (SHAH et al, 1998).

LI e colaboradores (2002) analisaram a correlação do polimorfismo C(-106)T, na região promotora do gene ALR2, e seu possível envolvimento com a expressão do mesmo. Foram analisados dois grupos de indivíduos na população chinesa, um grupo controle e um de indivíduos portadores de DM2. A fim de se detectar a atividade do promotor, foi utilizado o gene repórter “chloromycetin acetyl transferase” (CAT) como vetor. Segundo os autores, sob condições de hiperglicemia decorrente do DM e na presença do polimorfismo, há uma atividade transcricional dobrada do gene ALR2 em sua região regulatória, o que ativaria a via do sorbitol, levando à RD. Este estudo demonstra uma interação direta entre o polimorfismo C(-106)T e o mecanismo regulatório do gene nesta população em estudo.

Justificativa

Os resultados relatados por diferentes grupos, em sua maioria, demonstram uma correlação positiva entre polimorfismos no gene da aldose redutase e suscetibilidade ao desenvolvimento de complicações microvasculares em pacientes com diabetes.

Existe um relato de um dos polimorfismos do gene ALR2 [C(-106)T] em brasileiros portadores de DM2 (SANTOS et al, 2003), abordando as complicações renais e oculares, porém esse estudo foi realizado em uma população não representativa da miscigenação racial característica do Brasil. Portanto, um estudo mais abrangente dos polimorfismos do gene ALR2, AC(n) e C(-106)T, em uma população com DM1 (no DM1 ocorre maior participação de fatores genéticos em função de maior herdabilidade e menor participação de fatores ambientais do que no DM2, facilitando o seguimento clínico) permitiria avaliar o papel dos mesmos como possíveis fatores de risco para o desenvolvimento da retinopatia diabética em nossa população.

Finalizando, o entendimento da contribuição dos fatores genéticos para o desenvolvimento das complicações relacionadas ao diabetes, particularmente a retinopatia (uma das principais causas de cegueira irreversível) seria fundamental para aperfeiçoar o controle clínico desta moléstia.

OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

Uma vez que não há relatos do estudo desses polimorfismos em um contexto abrangente na população brasileira e que esta, por sua vez, é de etnia muito diferente das populações estudadas, este trabalho propõe:

1. Analisar a distribuição dos polimorfismos (AC)_n e C(-106)T em pacientes brasileiros portadores de *Diabetes Mellitus* tipo 1, com e sem retinopatia diabética (estudo do tipo caso-controle).

2. Avaliar a possível associação entre esses polimorfismos e a suscetibilidade à retinopatia diabética.

3 – CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 - Pacientes

O grupo de estudo consistiu de 64 pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1, com no mínimo 10 anos de doença, sendo 35 atendidos consecutivamente nos Ambulatórios de Endocrinologia Pediátrica e Endocrinologia de Adultos da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, 18 atendidos no Ambulatório de Endocrinologia, Disciplina de Clínica Médica da UNICAMP e 11 em consultórios particulares, no período de junho de 2003 a abril de 2005.

Os pacientes foram avaliados segundo os seguintes parâmetros: idade, sexo, raça, idade do diagnóstico do diabetes, tempo de doença, pressão arterial corrigida pela tabela de pressão arterial segundo sexo e idade (MEI et al, 2002), escore Z do índice de massa corporal (ZIMC) (Software Growth Analyser 3, Verson 3.0, Dutch Growth Foundation), dose de insulina, presença de complicações crônicas (neuropatia e proteinúria), hipertensão, hemoglobina glicada e fundo de olho.

Os conceitos para o diagnóstico DM foram clínicos.

3.2 - Exame fundoscópico

A avaliação do fundo de olho foi realizada por meio de fundoscopia indireta e biomicroscopia, em caso de anormalidades, documentada por retinografia.

Na presença de retinopatia diabética, a mesma foi classificada em: RDNP (subdividida em leve, moderada e grave) e RDP (“The Diabetes Control and Complications Trial Research Group”, 1993).

3.3 - Extração de DNA de sangue periférico

Os experimentos foram realizados a partir de DNA extraído de sangue periférico, obtido no momento dos exames de controle da doença, e executados no Laboratório de Medicina Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas (FCMSCSP).

A extração de DNA foi realizada pelo método de fenol clorofórmio em 90% das amostras, e por precipitação salina em 10% das amostras, a partir de 5 ml de sangue periférico, conforme descrito no anexos 1 e 2.

3.4 – Análise do polimorfismo (AC)n

3.4.1 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foi realizada por meio da PCR a amplificação de um fragmento de 138 pb que inclui a região de repetições AC, localizada 2.1 Kb à montante do gene ALR2, utilizando-se os *primers* sense 5'-GCCCAGCCCTATACCTAGT-3' e antisense 5'-GAATCTTAACATGCTCTGAACC-3' (Genbank U72619), sendo que o *primer* sense foi marcado na extremidade 5' com o corante fluorescente FAM (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Na reação, foram adicionados 5 pmoles do *primer* marcado e 20 pmoles do *primer* antisense não marcado, em conjunto com 200 μmoles de cada dNTP, tampão da enzima 1X (Tampão 10X: Tris-HCl 100mM, pH 8,3; KCl 500 mM; MgCl₂ 15 mM; gelatina 0,01% w/v), 0,5U de Taq DNA polimerase (Biotools B&M Labs. S.A., Madrid, Spain) e água deionizada estéril, completando o volume para 25 μL. Todos os *primers*, inclusive o marcado, foram sintetizados pela Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA).

A reação de polimerização em cadeia (PCR) foi padronizada segundo as seguintes características: 35 ciclos de desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, anelamento a 61°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, além de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos

e extensão final a 72°C por 1 hora, em aparelho ciclador de temperatura (GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

3.4.2 - Análise de fragmentos

Depois de realizada a amplificação, adicionou-se a 1 µL do produto da PCR, este diluído 1:7 em ddH₂O, mais 0,5 µL do marcador interno de peso molecular (GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard - Applied Biosystems, Warrington, UK) e 23,5 µL de formamida deionizada (Hi-Di™ Formamide - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Esta mistura foi desnaturada a (95°C) por dois minutos e mantida em gelo até ser submetida à eletroforese capilar no analisador automático de DNA ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os parâmetros da eletroforese capilar foram: temperatura de 60°C e tempo de corrida de 20 minutos por amostra. O resultado foi analisado através do software Gene Scan (ABI Prism® GeneScan Analysis Software version 3.7 for the Windows NT® Platform – Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) e Genotyper (ABI Prism® Genotyper® 307 NT Software - Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

3.4.3 - Seqüenciamento automático

Os pacientes que se apresentaram em homozigose quando analisados pelo software Gene Scan, foram selecionados para seqüenciamento a fim de se determinar o número de repetições de algumas amostras e assim estabelecer uma referência para a análise dos fragmentos. Realizou-se por meio da PCR a amplificação de um fragmento cujo tamanho variou segundo o n° de repetições AC (281pb segundo referência do Genbank), localizada 2.1 Kb à montante do gene ALR2, (Genbank U72619), utilizando-se os *primers* sense 5'-GGACTAAGGGAAGGCAAGTG-3' e antisense 5'-CCTTCAATGGAATCCTCCTG-3'. Na

reação foram adicionados 20 pmoles de cada *primer* em conjunto com 200 µmoles de cada dNTP, tampão da enzima 1X (Tampão 10X: Tris-HCl 100mM, pH 8,3; KCl 500 mM; MgCl₂ 15 mM; gelatina 0,01% w/v), 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e água deionizada estéril, completando o volume para 25 µL. Todas as amostras foram submetidas a um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 1 minuto e, subsequentemente, a 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 63°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por 1 ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos. Após a reação de PCR, o produto foi purificado por centrifugação, segundo as especificações sugeridas pelo “kit” Marligen-Bioscience (Ijamsville, MD, USA). Para a quantificação do produto amplificado, 2 µl do material purificado foram aplicados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, submetidos à eletroforese e examinados sob luz ultravioleta (UV). A concentração de DNA da amostra purificada foi estimada a partir da comparação com a intensidade da banda do marcador de peso e massa molecular Low DNA Mass Ladder (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA).

Para a reação de seqüenciamento foram utilizados de 3 a 10 ng do produto purificado para um volume final de reação de 10 µL, contendo 1 µL de “Big Dye Terminator Ready Reaction v2.0” (ABI PRISM Big Dye terminator Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems Foster City, CA, USA), 3µL do tampão de seqüenciamento 5X (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) e 1,6 pmol de um dos *primers* (sense ou antisense) utilizados na PCR, sendo o volume final completado com água deionizada estéril.

As condições da reação de seqüenciamento foram as seguintes: 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, a 50°C por 5 segundos e a 60°C por 4 minutos. Após esta reação, as amostras foram novamente purificadas para eliminação dos nucleotídeos não incorporados (Anexo 5).

As amostras foram ressuspensas em 15 µL de Formamida Hi-Di (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA), desnaturadas a (95°C) por 3 minutos, colocadas em gelo e submetidas à

eletroforese no analisador automático “ABI PRISM 310” (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA). Para confirmação da região genômica analisada, as seqüências foram submetidas a buscas por similaridade, utilizando-se o “algoritmo de buscas” *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

3.5 - Análise do polimorfismo C(-106)T

3.5.1 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi utilizada para a amplificação do fragmento da região promotora do gene ALR2 contendo o polimorfismo C(-106)T. O desenho dos *primers* baseou-se na seqüência depositada no Genbank sob o número (U72619). Com o uso do programa computacional Primer3 Input (primer3_www.cgi v 0.2), selecionamos os seguintes pares de *primers*: AR sense 5'-TTCGCTTTCCCACCAGATAC-3', compreendido entre os nucleotídeos -255 e -235 e AR antisense 5'-CGCCGTTGTTGAGCAGGAGAC-3', compreendido entre os nucleotídeos 50 e 71 o que resulta na amplificação de um fragmento de 326 pb pares de bases.

Todos os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Para a reação de PCR, às amostras de DNA foram adicionados 20 pmoles dos *primers* sense e anti-sense em conjunto com 200 µmoles de cada dNTP, tampão da enzima 1X (Tampão 10X: Tris-HCl 100mM pH 8.3; KCl 500 mM; MgCl₂ 15 mM; gelatina 0,01% w/v), 0,5 U de Taq DNA polimerase (Biotools B&M Labs. S.A., Madrid, Spain), completando-se o volume final da reação para 25µL com água deionizada estéril. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a (95°C) por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto e a 72° C por 1 minuto, finalizando-se com uma extensão a 72°C por 7 minutos, em aparelho ciclador de temperatura (GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

Ao final da reação, 5 µL do produto da PCR foram misturados a 1 µL do tampão de corrida 10X “Blue Juice-Gel Loading Buffer” (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e visualizados sob iluminação UV. A imagem foi digitalizada através da câmera “Kodak Digital Science” (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

3.5.2 – Digestão enzimática

Para a detecção do polimorfismo C(-106)T realizou-se a digestão com a endonuclease de restrição *BfaI* (New England BioLabs, MA, USA), visto que esta substituição cria um novo sítio de restrição para a enzima. Foram usadas 8 unidades de *BfaI* e 10µl do produto da PCR, no tampão apropriado, incubando-se a reação a 37°C durante 2 h. O genótipo foi determinado após eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Os indivíduos homozigotos CC, apresentam dois fragmentos, de 234pb e 92pb, os indivíduos homozigotos TT apresentam três fragmentos, de 175pb, 92pb e 59pb e, finalmente, os indivíduos heterozigotos CT apresentam quatro fragmentos, de 234pb, 175pb, 92pb e 59pb (KAO et al.,1999).

3.6 - Análise estatística

Realizou-se a análise descritiva dos dados epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e moleculares da população.

De acordo com o resultado do fundo de olho, os pacientes foram divididos em: 1. NORMAL e RD; 2. NORMAL, RDNP e RDP; 3. NORMAL e RDP e 4. RDNP e RDP. O fenótipo, segundo a classificação do exame oftalmoscópico de fundo de olho (FO) foi

comparado com os genótipos e frequências alélicas dos polimorfismos C(-106)T e AC(n), além do nível de hemoglobina glicada (HbAc).

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se o Teste de Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher para análise de variáveis categóricas e o Teste de Mann Whitney para comparação de variáveis contínuas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software “Statistical Program for the Social Sciences” (SPSS, versão 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4 - RESULTADOS

4.1 – Análise descritiva

Os pacientes estudados apresentaram idade média de 26,72 anos $\pm$ 10,52, sendo a idade mínima de 12,10 e a idade máxima de 57,00 anos. Quarenta e três pacientes eram do sexo feminino (67,2%) e, em relação à cor da pele, 47 eram brancos (73,4%), 5 negros (7,8%) e 12 pardos (18,8%). A distribuição dos pacientes segundo os dados clínicos e laboratoriais encontra-se nos anexos 6 a 9

Ao serem avaliadas as frequências dos genótipos e alelos dos polimorfismos estudados, observa-se: 1. O genótipo mais comum do polimorfismo AC(n) foi o Z/Z-2 (26,6%), seguido pelo Z/Z+2 (12,5%) e Z-2/Z-2 (12,5%), tendo sido observados, ao todo, 18 genótipos diferentes; 2. Os alelos mais comuns para esse polimorfismo foram o Z-2 (35,2%), o Z (35,2%) e o Z+2 (15,6%) (Tab. 1). 3. O genótipo mais comum do polimorfismo C(-106)T foi o CT correspondendo a 50% dos casos, seguido pelo CC, correspondendo a 40,3% dos casos analisados. 4. Em relação à distribuição dos alelos deste polimorfismo, o alelo C, perfazendo 65,3% dos casos foi mais frequente que o alelo T (34,7%) (Tab. 2). As figuras 5 e 6 exemplificam os resultados da genotipagem dos polimorfismos AC(n) e C(-106)T, respectivamente.

TABELA 1. Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo AC(n) do gene ALR2.

Genótipo	Frequência (%) N=64
Z-4/Z-2	3 (4,7)
Z-4/Z+4	1 (1,6)
Z-2/Z-6	1 (1,6)
Z-2/Z-2	8 (12,5)
Z-2/Z	17 (26,6)
Z-2/Z+2	6 (9,4)
Z-2/Z+4	1 (1,6)
Z-2/Z+6	1 (1,6)
Z/Z-6	1 (1,6)
Z/Z-4	3 (4,7)
Z/Z	7 (10,9)
Z/Z+2	8 (12,5)
Z/Z+4	1 (1,6)
Z/Z+6	1 (1,6)
Z+2/Z+2	2 (3,1)
Z+2/Z+4	1 (1,6)
Z+2/Z+6	1 (1,6)
Z+4/Z+4	1 (1,6)
Alelos	Frequência (%) N=128
Z+6	3 (2,3)
Z+4	6 (4,7)
Z+2	20 (15,6)
Z	45 (35,2)
Z-2	45 (35,2)
Z-4	7 (5,5)
Z-6	2 (1,6)

TABELA 2. Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo C(-106)T do gene ALR2.

Genótipo	Frequência (%) N=62
CC	25 (40,3)
CT	31 (50,0)
TT	6 (9,7)
Alelos	Frequência (%) N=124
C	81 (65,3)
T	43 (34,7)

(AC)21
Variação dos picos (pb)
130,77 a 131,04

(AC)22
Variação dos picos (pb)
132,85a 133,15

(AC)23
Variação dos picos (pb)
134,95 a 135,35

(AC)24
Variação dos picos (pb)
137,11 a 137,47

(AC)25
Variação dos picos (pb)
139,33 a 139,65

(AC)26
Variação dos picos (pb)
141,57 a 142,00

(AC)27
Variação dos picos (pb)
143,97 a 144,36

Total de amostras = 64

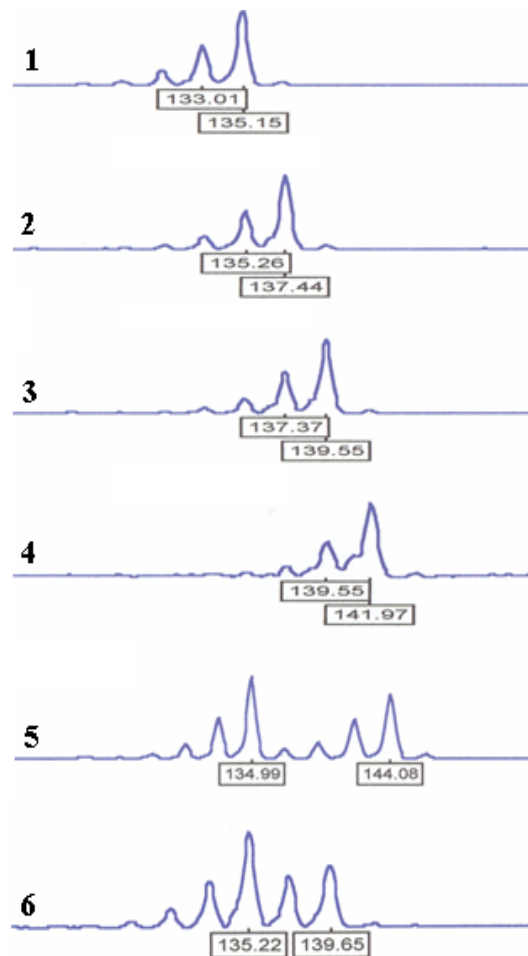


FIGURA 5. Representação de alguns padrões de genotipagem do polimorfismo AC(n) do gene ALR2. 1 a 4. Pacientes homozigotos, portadores de 23, 24, 25 e 26 repetições AC, respectivamente. 5. Paciente heterozigoto, portador de 23 e 27 repetições e 6. Paciente heterozigoto, portador de 23 e 25 repetições.

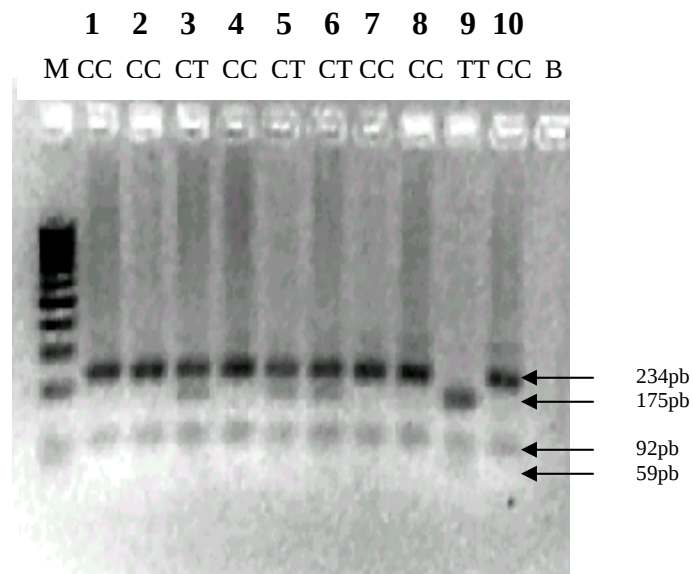


FIGURA 6. Representação da análise do polimorfismo C(-106)T do gene ALR2 por meio de digestão com a enzima *Bfa*I. M. Marcador de peso molecular (Ladder 100pb), B. Branco, 1,2,4,7,8,10. Pacientes homozigotos para o genótipo CC, 3,5,6. Pacientes heterozigotos para o genótipo CT. 9. Paciente homozigoto para o genótipo TT.

4.2 - Análise comparativa

Dados Demográficos, Clínicos e Laboratoriais.

Os pacientes, estratificados de acordo com o resultado do FO em normal, RDNP e RDP, foram avaliados segundo a idade, idade ao diagnóstico, tempo de doença, ZIMC, média dos valores da PA sistólica e diastólica, percentil da PA sistólica e PA diastólica, dose de insulina (U/Kg/dia) e nível de hemoglobina glicada (Tabs. 3 e 4). Não foi possível avaliar a presença ou ausência de HAS, uma vez que na amostra analisada não havia pacientes hipertensos. Dentre estas características, a idade e o tempo de doença demonstraram-se significativamente maiores nos pacientes com RDP

TABELA 3. Características demográficas e clínicas dos pacientes de acordo com o FO.

	NORMAL			RDNP			RDP		
	n	Média(±DP)	Min Max	n	Média(±DP)	Min Max	n	Média(±DP)	Min Max
ID (anos) *	33	24,16±9,59	12,10 48,00	16	25,54±9,86	15,00 44,00	15	33,60±10,76	20,00 57,00
ID ao diagnóstico (anos)	33	9,76±8,68	1,00 35,00	16	10,11±7,23	0,90 29,00	15	13,13±8,26	2,00 31,00
TD (anos) *	33	14,43±3,81	10,00 24,00	16	15,44±4,86	10,00 27,00	15	20,47±6,72	11,00 38,00
Z IMC	23	0,003±1,17	-2,40 2,02	14	-0,22±1,16	-1,72 1,83	4	0,30±0,96	-0,54 1,60
PA sist (mmHg)	25	114,60±9,82	97,50 130,00	14	113,93±8,15	100,00 125,00	5	117,60±13,24	100,00 137,00
PA diast (mmHg)	25	75,04±7,21	60,00 85,00	14	75,54±6,67	60,00 85,00	5	75,00±8,92	60,00 83,00
Insulina (U/Kg/dia)	22	1,02±0,42	0,37 2,08	14	1,04±0,77	0,45 3,33	5	0,74±0,25	0,52 1,05

- ID= idade
- TD= tempo de doença
- ZIMC= Escore Z do Índice de Massa Corporal
- PA= pressão arterial

* Os valores de P foram significantes para ID e TD quando comparados os grupos:

N X RD = (ID: P=0,036; TD: P=0,015)

RDNP X RDP = (ID: P=0,021; TD: P=0,015)

N X RDP = (ID: P=0,002; TD: P=0,001)

(Teste de Mann Whitney)

TABELA 4. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes de acordo com o FO.

	NORMAL	RDNP	RDP
% PA Sistólica			
<10	5 (55,6%)	3 (33,3%)	1 (11,1%)
10-90%	20 (57,1%)	11 (31,4%)	4 (11,4%)
% PA Diastólica			
<10	2 (50,0%)	1 (25,0%)	1 (25,0%)
10-90%	23 (57,5%)	13 (32,5%)	4 (10,0%)
Hb Ac			
Normal	5 (71,4%)	0 (0,0%)	2 (28,6%)
Alterada	23 (51,1%)	11 (24,4%)	11 (24,4%)
%Hb Ac (VALN)			
< 1%	5 (71,4%)	0 (0,0%)	2 (28,6%)
1-3%	13 (59,1%)	5 (22,7%)	4 (18,2%)
> 3%	10 (43,5%)	6 (26,1%)	7 (30,4%)

- PA= pressão arterial
- HbAc= hemoglobina glicada
- VALN = valores acima do limite da normalidade
- Nenhum valor de P significativo quando os grupos foram comparados entre si.
(Teste de Qui-quadrado)

Polimorfismo AC(n)

Não foi observada associação entre os diferentes genótipos do polimorfismo AC(n) e o desenvolvimento de RD, quando estes foram avaliados isoladamente. Quando cada alelo foi avaliado separadamente em relação ao resultado do FO, observou-se que apenas o alelo Z estava significativamente associado à presença de RDP, segundo as estratificações: Normal X RDNP X RDP, Normal X RDP e RDNP X RDP, não tendo sido encontrada diferença segundo a classificação Normal X RD (Normal X RDP: risco =3,01 vezes, RDNP X RDP: risco=3,92 vezes). A distribuição dos alelos do polimorfismo AC(n) em relação à classificação do FO em normal, RDNP e RDP encontra-se na tabela 5. As tabelas 6,7 e 8 mostram a distribuição dos pacientes segundo a presença ou ausência do alelo Z e o desenvolvimento de RDP. Quando analisados os genótipos dos indivíduos, considerando-se a

presença ou ausência do alelo Z, os dados sugerem que indivíduos cujo genótipo é ZZ sejam mais suscetíveis ao desenvolvimento de RDP, apesar do pequeno número de pacientes incluídos na análise (Tab. 9). Os genótipos foram comparados dois a dois em relação ao FO (ZZ x ZX, ZZ x XX e ZX x XX), confirmando a suscetibilidade ao desenvolvimento da complicação para os indivíduos ZZ em relação aos indivíduos XX (Tab 10).

Tabela 5. Distribuição dos alelos do polimorfismo AC(n) nos pacientes normais (sem alteração de fundo de olho), com RDNP e com RDP.

Alelo	Fundo de Olho		
	Normal (%) N=66	RDNP (%) N=32	RDP (%) N=30
Z+6	2 (3,0)	1 (3,1)	0 (0,0)
Z+4	4 (6,1)	1 (3,1)	1 (3,3)
Z+2	13 (19,7)	5 (15,6)	2 (6,7)
Z	20 (30,3)	8 (25, 0)	17 (56,7)
Z-2	23 (34,8)	14 (43,8)	8 (26,7)
Z-4	3 (4,5)	3 (9,4)	1 (3,3)
Z-6	1 (1,5)	0 (0,0)	1 (3,3)

RDNP = Retinopatia Diabética Não Proliferativa

RDP = Retinopatia Diabética Proliferativa

N = Número de cromossomos analisados: 128

TABELA 6. Avaliação da presença do alelo Z do polimorfismo AC(n) em relação à RD segundo a classificação em: normal, RDNP e RDP.

Alelo Z	Fundo de Olho		
	RDP (%) N=30	RDNP (%) N=32	Normal (%) N=66
Presente	17 (56,7)	8 (25,0)	20 (30,3)
Ausente	13 (43,3)	24 (75,0)	46 (69,7)

Teste de Qui-quadrado: p=0,016

RDNP = Retinopatia Diabética não Proliferativa

RDP = Retinopatia Diabética Proliferativa

N = Número de alelos = 128

TABELA 7. Avaliação da presença do alelo Z do polimorfismo AC(n) em relação à RD segundo a classificação em: normal e RDP.

Alelo Z	Fundo de Olho	
	RDP (%) N=30	Normal (%) N=66
Presente	17 (56,7)	20 (30,3)
Ausente	13 (43,3)	46 (69,7)

Teste de Qui-quadrado: $p=0,014$
Odds Ratio = 3,01 (1,23 – 7,34 intervalo de confiança = 95%)

RDP = Retinopatia Diabética Proliferativa
N = Número de alelos = 96

TABELA 8. Avaliação da presença do alelo Z do polimorfismo AC(n) em relação à RD segundo a classificação em: RDNP e RDP.

Alelo Z	Fundo de Olho	
	RDP (%) N=30	RDNP (%) N=32
Presente	17 (56,7)	8 (25,0)
Ausente	13 (43,3)	24 (75,0)

Teste de Qui-quadrado: $p=0,011$
Odds Ratio = 3,92 (1,34 – 11,53 intervalo de confiança = 95%)

RDP = Retinopatia Diabética Proliferativa
RDNP = Retinopatia Diabética não Proliferativa
N = Número de alelos = 62

TABELA 9. Distribuição dos genótipos do polimorfismo AC(n) de acordo com a presença do alelo Z nos pacientes com e sem RDP.

Genótipo	Fundo de Olho	
	RDP (%) N=15	Normal (%) N=33
ZZ	4 (26,7)	2 (6,1)
ZX	9 (60, 0)	16 (48,5)
XX	2 (13,3)	15 (45,5)

X = qualquer outro alelo que não Z
Teste de Qui quadrado: $p = 0,034$

RDP = Retinopatia Diabética Proliferativa
N = Número de pacientes = 48

TABELA 10. Distribuição do polimorfismo AC(n) de acordo com a presença do genótipo ZZ nos pacientes com ou sem RDP

Genótipo	Fundo de Olho	
	RDP (%) N=6	Normal (%) N=17
ZZ	4 (66,7)	2 (11,8)
XX	2 (33,3)	15 (88,2)

X = qualquer outro alelo que não Z

Teste exato de Fisher: p = 0,021

Uma vez que nossos dados sugerem uma associação entre o alelo Z e a suscetibilidade à RDP, o tempo de doença foi avaliado em relação à presença deste alelo, com o intuito de compreender melhor o papel do genótipo em relação ao fenótipo. Observamos que esta variável não foi significativamente diferente entre os grupos com e sem o alelo Z (Tab. 11). Para a análise da equivalência da variância foi utilizado o teste de Levene.

TABELA 11. Teste t de Student não pareado para comparação das médias do tempo de doença em relação à presença do alelo Z do polimorfismo AC(n).

				TtEM
		N	Média ± DP	p
TD	Z +	38	17,17 ± 5,84	0,053
(genótipo)	Z -	26	14,52 ± 4,31	
TD	Z +	45	16,74 ± 5,64	0,317
(alelos)	Z -	83	15,74 ± 5,23	

TD = Tempo de Doença

Z + = Presença do Alelo Z

Z - = Ausência do Alelo Z

N = Número de Pacientes

DP = Desvio Padrão

TtEM = Teste t para Equivalência entre as Médias

Quando investigada a correlação entre a presença do alelo Z e o nível de HbAc (normal ou alterado), não foi observada diferença entre os grupos (p=0,619).

Polimorfismo C(-106)T

Em relação ao polimorfismo C(-106)T, devido ao número reduzido de pacientes portadores do genótipo TT, não foi possível estabelecer a existência de associação entre os genótipos e a suscetibilidade ao desenvolvimento de RD. Contudo, nossos dados mostram que dentre os 14 pacientes com RDP, nenhum apresentou o genótipo TT (Tab. 12). Quando os alelos foram analisados separadamente, também não foi observada associação entre os mesmos e suscetibilidade ou proteção ao desenvolvimento da doença (Tab. 13, 14 e 15). Quando os pacientes foram analisados em relação à presença dos alelos C e Z concomitantemente e o desenvolvimento de RD, observou-se que a presença desses alelos, em conjunto, também representam uma tendência ao desenvolvimento de RD, segundo a classificação: Normal X RDP (Tab.16) (AleloC +aleloZ: risco de RD =5,65 vezes).

TABELA 12. Distribuição dos pacientes normais, com RDNP e RDP segundo os genótipos do polimorfismo C(-106)T.

Genótipo	Fundo de Olho		
	Normal (%) N=33	RDNP (%) N=15	RDP (%) N=14
CC	10 (30,30)	8 (53,33)	7 (50,00)
CT	18 (54,54)	6 (40,00)	7 (50,00)
TT	5 (15,16)	1 (6,67)	0 (0,00)

RDNP = Retinopatia Diabética Não Proliferativa

RDP = Retinopatia Diabética Proliferativa

N = Número de pacientes = 62

TABELA 13. Distribuição dos pacientes normais e com retinopatia diabética segundo os alelos do polimorfismo C(-106)T.

Alelo	Fundo de Olho	
	RD (%) N=58	Normal (%) N=66
C	43 (74,1)	38 (57,6)
T	15 (25,9)	28 (42,4)

Teste de Qui-quadrado: p = 0,053

RD = Retinopatia Diabética
N= Número de alelos = 124

TABELA 14. Distribuição dos pacientes normais, com RDNP e RDP segundo os alelos do polimorfismo C(-106)T.

Alelo	Fundo de Olho		
	Normal (%) N=66	RDNP (%) N=30	RDP (%) N=28
C	38 (57,6)	22 (73,3)	21 (75,0)
T	28 (42,4)	8 (26,7)	7 (25,0)

Teste de Qui-quadrado: p = 0,153

RDNP = Retinopatia Diabética Não Proliferativa
RDP = Retinopatia Diabética Proliferativa
N = Numero de alelos = 124

TABELA 15. Distribuição dos pacientes normais e com RDP segundo os alelos do polimorfismo C(-106)T.

Alelo	Fundo de Olho	
	RDP(%) N=28	Normal (%) N=66
C	21 (75,0)	38 (57,6)
T	7 (25,0)	28 (42,4)

Teste de Qui-quadrado: p = 0,110

RDP = Retinopatia Diabética Proliferativa
N = Número de alelos = 94

TABELA 16. Distribuição dos pacientes normais e com RDP segundo a presença do alelo C do polimorfismo C(-106)T e do alelo Z do polimorfismo AC(n) simultaneamente.

Alelo C + Alelo Z	Fundo de Olho	
	RDP(%) N=14	Normal (%) N=33
Presente	12 (85,7)	17 (51,5)
Ausente	2 (14,3)	16 (48,5)

Teste de Qui-quadrado: $p = 0,027$
Odds Ratio = 5,65 (1,09 – 29,26 intervalo de confiança = 95%)

RDP = Retinopatia Diabética Proliferativa

N = Número de pacientes = 47

Quando investigada a correlação entre a presença do alelo C e o nível de HbAc (normal ou alterado), não foi observada diferença entre os grupos ($p = 0,825$).

5 – DISCUSSÃO

Vários aspectos, direta ou indiretamente, estão relacionados ao desenvolvimento da RD. Dentre os fatores diretos podemos citar como de grande importância a duração do DM. Após 20 anos de duração da doença, quase todos os pacientes com DM1 apresentam algum grau de RD. O controle glicêmico também se enquadra nesta relação visto que o controle da glicemia reduz a incidência de RD, reforçando a associação entre ambas. Dentre os fatores indiretamente relacionados podemos citar a HAS, duas vezes mais freqüente na população com DM. Apesar da importância dos componentes mencionados anteriormente, fatores genéticos têm cada vez mais sido associados ao desenvolvimento de microangiopatias como a RD, apesar destes aspectos ainda não estarem bem esclarecidos. Em recentes estudos, os polimorfismos (AC)_n e C(-106)T na região promotora do gene ALR2 e suas possíveis influências na expressão do gene codificador da AR têm sido analisados, podendo ou não interferir no desenvolvimento da RD.

Quando analisamos em nosso trabalho o polimorfismo (AC)_n, encontramos 7 diferentes repetições destes dinucleotídeos, (Z-6, Z-4, Z-2, Z, Z+2, Z+4, Z+6), sendo os alelos mais freqüentes o Z-2 (35,2%), representado por 23 repetições AC, juntamente com o alelo Z (35,2%). Este resultado, apesar de ser diferente da maioria dos trabalhos realizados, que observaram somente o alelo Z como sendo o mais freqüente (DEMAINE et al, 2000; IKEGISHI et al, 1999), é condizente com as pesquisas realizadas por ICHIKAWA e colaboradores (1999) cujo grupo também observou o alelo Z-2 em maior número. A variação dos dinucleotídeos nos trabalhos realizados foi de no mínimo 5 (OLMOS et al, 2000) a no máximo 13 alelos (WANG et al, 2003), onde a menor e maior repetição de dinucleotídeos foi observada no modelo de WANG e colaboradores (2003), de Z-16 a Z+12. Quando observamos a variação dos genótipos em nosso trabalho, encontramos 18 diferentes

combinações dentre os alelos, seguido por IKEGISHI et al (1999) com 14 genótipos, ICHIKAWA et al (1999) com 12 genótipos, OLMOS et al (2000) com 7 genótipos e PARK et al (2001) com 6 genótipos diferentes.

Resultados de diferentes grupos têm constatado associação significativa entre o polimorfismo Z-2 e o desenvolvimento da RD (KO et al, 1995; KAO et al, 1999). Da mesma forma, o alelo Z+2 tem representado um caráter protetor, pois não é um genótipo freqüente em indivíduos portadores de RD (YAMAMOTO et al, 2003). Também há relatos de estudos onde foram detectados tanto os fatores de proteção do Z+2 quanto os fatores de suscetibilidade do Z-2 à RD (DEMAINE et al, 2000). Nos estudos de IKEGISHI et al (1999) e ICHIKAWA et al (1999), observou-se, no entanto, que o caráter de predisposição à RD está relacionado ao alelo Z-4 e no trabalho de WANG et al (2003), que o alelo Z+6 é um fator de proteção à RD. Contudo, alguns estudos contradizem os resultados previamente relatados, como os de PARK et al (2001) na população coreana, o qual não constatou nem relação protetora nem relação com a suscetibilidade de nenhum de seus alelos estudados.

Em nosso estudo na população brasileira, apesar do pequeno número de pacientes, constatamos que o alelo Z pode estar associado ao desenvolvimento da RDP, estando esses pacientes sob um risco consideravelmente maior quando comparados a indivíduos portadores de outros alelos. Este dado difere de todos os demais grupos estudados, porém é importante considerarmos que nossa população, por ser amplamente miscigenada e por não haver referência ao estudo deste polimorfismo na mesma, poderia apresentar esta singularidade como uma característica própria. Quando analisamos os resultados observados nas diferentes populações estudadas, podemos comprovar a importância dos fatores étnicos na determinação da variação genética, uma vez que estas se reproduzem dentre as mesmas populações. Um exemplo bem caracterizado pode ser constatado ao compararmos os resultados das pesquisas de ICHIKAWA et al (1999) e IKEGISHI et al (1999) na população japonesa. Ambos os

trabalhos sugerem que o alelo Z-4 esteja associado ao desenvolvimento de RD naquela população. Da mesma forma, com resultados similares entre si, podemos citar o trabalho na população chinesa onde o alelo Z-2 é fator de suscetibilidade à RD (KO et al, 1995; WANG et al, 2003). Considerando que até o momento não tenha sido realizado nenhum trabalho relacionado a este polimorfismo na população brasileira, podemos dizer que nossos resultados indicam que o alelo Z está relacionado ao desenvolvimento de RDP nesta amostra de nossa população.

Apesar do tempo de doença de nossos pacientes ser maior no grupo com a complicação, este fator parece não anular a presença do alelo Z como fator de suscetibilidade ao desenvolvimento de RD, uma vez que esta variável não foi significativamente diferente entre os grupos com e sem o alelo Z. Se considerarmos todos os indivíduos portadores do alelo Z, também não houve diferença do tempo de doença entre o grupo com e sem RD e ao avaliarmos somente os indivíduos com retinopatia, o tempo de doença também não foi diferente em relação à presença ou ausência do alelo Z. Dados consistentes, entretanto, só seriam obtidos por meio de uma análise multi-variada, que permitiria a observação do comportamento do alelo Z na presença de outras variáveis. Infelizmente, devido ao número reduzido de nossa amostra, não foi possível concluirmos tal avaliação.

Para que seja estabelecida a provável relação do alelo Z do polimorfismo AC(n) com a predisposição ao desenvolvimento da RDP, estudos de expressão do gene ALR2 em nossa população de pacientes com DM1 se fazem necessários. Um exemplo deste tipo de estudo foi realizado por SHAH e colaboradores (1998), que estudaram dois grupos de pacientes, o grupo UNMHSC com indivíduos de origem hispânica e caucasiana e o grupo HSR com uma população mais homogênea de origem italiana. Em ambos os grupos foram selecionados indivíduos diabéticos e não diabéticos com ou sem nefropatia diabética. Considerando somente os indivíduos diabéticos, houve aumento da expressão do RNAm tanto nos

indivíduos homozigotos quanto nos heterozigotos em relação à presença do alelo Z-2 nos grupos estudados. No grupo UNMHSC, diabéticos e homozigotos Z-2 apresentaram maior expressão do gene ALR2 quando comparados com indivíduos heterozigotos para o polimorfismo, fato que não se constatou no grupo HSR onde tanto homozigotos quanto heterozigotos apresentaram expressão gênica similar. Em indivíduos não diabéticos, em ambos os grupos, não se constatou relação entre o polimorfismo Z-2 e aumento da expressão do RNAm. Segundo o autor, estas observações fundamentam a hipótese de que este polimorfismo esteja associado à elevação do nível de expressão do gene ALR2, apesar do mecanismo não ter sido identificado. Indiretamente a expressão de outros genes próximos ao *locus* e a possível influência do elemento responsivo TonE podem de alguma forma estar relacionados à expressão do gene (SHAH et al, 1998).

Quando nos direcionamos a analisar os genótipos de nossos pacientes, não encontramos correlação entre suscetibilidade ou proteção ao desenvolvimento da RD, provavelmente devido ao pequeno número de pacientes para cada genótipo, resultados semelhantes aos de ICHIKAWA et al (1999); OLMOS et al (2000) e PARK et al (2001). No trabalho de IKEGISHI et al (1999), o genótipo Z/Z+2 não foi relacionado de forma significativa à RD, mas mostrou uma forte tendência a um caráter protetor ao desenvolvimento da doença. Na pesquisa de WANG et al (2003) foram encontradas correlações entre o genótipo X/Z+6 (onde X pode ser qualquer outro alelo) e Z+6/Z+6 e proteção ao desenvolvimento de RD. Nos estudos de DEMAINE et al (2000), associou-se de forma significativa o genótipo Z-2/X (onde X não é Z+2) à suscetibilidade e o genótipo Z+2/Y (onde Y não é Z-2) à proteção em relação à RD. No trabalho de KAO et al (1999), os genótipos Z-2/Z-2 e Z-2/X (onde X pode ser qualquer outro alelo) foram associados estatisticamente ao desenvolvimento da RD.

A análise do polimorfismo C(-106)T demonstrou uma frequência dos alelos C de 65,3% e T de 34,7% e dos genótipos CC, CT e TT igual a 40,3%, 30% e 9,7%, respectivamente. Quando comparamos com os trabalhos de SANTOS et al (2003); DEMAINE et al (2000) e KAO et al (1999), observamos que as porcentagens foram similares às descritas por eles. Estes trabalhos sugerem que o alelo T confere certa proteção quanto ao desenvolvimento de RD e o alelo C confere suscetibilidade à RD. Quando analisado o polimorfismo C(-106)T no trabalho de SANTOS et al (2003), não foi encontrada associação estatística significativa para este dado. Porém, KAO et al (1999) e DEMAINE et al (2000) em seus respectivos estudos, encontraram correlação com o desenvolvimento da RD. Em relação ao aspecto funcional, LI e colaboradores (2002) analisaram a possível correlação entre o polimorfismo C(-106)T na região promotora do gene ALR2, e a expressão do mesmo. Foram analisados dois grupos de indivíduos chineses, sendo um grupo controle sem DM (123 indivíduos) e outro grupo de portadores de DM2 (145 indivíduos). Quando comparados os indivíduos diabéticos com e sem RD, observou-se uma frequência significativamente aumentada do polimorfismo C(-106)T no grupo com a complicação. Segundo os autores, sob condições de hiperglicemia decorrente do DM e na presença do polimorfismo, haveria uma atividade transcricional dobrada do gene ALR2 em sua região regulatória, o que ativaria a via do sorbitol, levando à RD. Este estudo demonstra uma interação direta entre o polimorfismo C(-106)T e o mecanismo regulatório do gene nesta população em estudo.

Em nosso grupo de estudo, não foi possível estabelecer associação estatística entre os genótipos do polimorfismo C(-106)T e a complicação, devido ao pequeno número de indivíduos com o genótipo TT, mas observamos que nenhum dos indivíduos com RDP apresentou o genótipo TT e entre os 6 indivíduos portadores deste genótipo, 5 eram normais e 1 apresentava uma forma mais leve de RD. Em relação ao alelo C, este não foi relacionado à suscetibilidade à RD quando analisado isoladamente. É evidente que o tamanho de nossa

amostra não foi suficiente para termos uma análise estatística conclusiva, mas estes resultados sugerem uma tendência do alelo T à proteção ao desenvolvimento de RD

Quando estes polimorfismos, tanto o C(-106)T quanto o (AC)_n foram analisados em conjunto por KAO et al (1999) e DEMAINE et al (2000), foi constatado que o alelo C associado ao Z-2 está relacionado ao desenvolvimento da RD. No ano de 2000, DEMAINE e colaboradores também observaram que os polimorfismos Z+2/C e Z+2/T indicam um fator de proteção ao desenvolvimento de RD. Já WANG e colaboradores (2003) associaram o alelo T à RD, independentemente de sua correlação com os alelos do polimorfismo (AC)_n. Em nosso grupo de estudo, ao analisarmos o alelo C associado ao Z, observamos um risco consideravelmente aumentado de desenvolvimento de RD nos indivíduos que apresentam estes alelos concomitantemente.

Em nossa amostra de pacientes, apesar do critério de inclusão ter sido no mínimo 10 anos de DM, observou-se uma diferença estatística significativa em relação ao tempo de doença e o desenvolvimento da complicação, fator aceito como um consenso na literatura. Ao analisarmos este fator nos trabalhos publicados, percebemos que a faixa de corte em relação ao tempo de doença para os pacientes com e sem RD é variável, provavelmente pela dificuldade de se obter um número considerável de pacientes com tempo de doença adequado, (considerado entre 15 e 20 anos após detecção clínica do DM). Trabalhos como os de WANG et al (2003) e ICHIKAWA et al (1999) ambos em pacientes portadores de DM2 estabeleceram 5 anos como idade de corte. Já DEMAINE et al (2000), conseguiram estabelecer como idade de corte para diabéticos do tipo 1, 20 anos de doença, em função de sua amostra ser considerável e, IKEGISHI et al (1999), conseguiram estabelecer como base os pacientes com 8 anos da doença. Em nosso estudo, pela necessidade de se ter uma amostra razoável para a análise dos dados, foi estabelecido o tempo mínimo de 10 anos em indivíduos

portadores de DM1, haja vista que a utilização dos tempos entre 15 e 20 anos tornaria impossível a análise estatística.

Apesar de estabelecermos, em função das circunstâncias, um tempo de doença menor que de alguns trabalhos, podemos considerar que nossos resultados estatísticos sugerem um risco aumentado para o desenvolvimento da RDP na população diabética e portadora do alelo Z do polimorfismo AC(n). Futuros projetos poderiam ser levados em consideração, pois, o ideal seria uma amostra de diabéticos tipo 1 entre 15 e 20 anos de doença e de uma representação da população de uma forma mais abrangente em função da grande miscigenação da população brasileira. Assim sendo, poderíamos somar dados mais conclusivos em relação à real influência destes polimorfismos no desenvolvimento da RD na população brasileira.

CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

1. O genótipo mais comum do polimorfismo AC(n) foi o Z/Z-2 (26,6%), seguido pelo Z/Z+2 (12,5%) e Z-2/Z-2 (12,5%), tendo sido observados, ao todo, 18 genótipos diferentes; os alelos mais comuns para esse polimorfismo foram o Z e Z-2, correspondendo a 35,2% cada um.
2. O genótipo mais comum do polimorfismo C(-106)T foi o CT correspondendo a 50% dos casos, seguido pelo CC, correspondendo a 40,3% dos casos analisados; o alelo mais comum foi o C, totalizando 65,3% dos casos.
3. Nosso estudo sugere que o alelo Z (24 repetições) esteja associado com a suscetibilidade ao desenvolvimento de retinopatia diabética proliferativa.
4. Existe uma tendência aos pacientes portadores do genótipo TT de serem protegidos em relação ao desenvolvimento de RD.
5. Não foi encontrada associação entre a presença do alelo C e suscetibilidade ao desenvolvimento de RD.

7 - ANEXOS

ANEXO 1

Extração DNA de sangue periférico

(método de Lahiri & Nurberger, 1991 – modificado por Cavalli 1996 e Salazar 1997)

Preparo:

- Sangue colhido em tubo com EDTA (tampa roxa)
 - Estabilizar sangue à temperatura ambiente
 - Ligar banho seco, fixando temperatura em 65 °C
1. Adicionar 600 µl de sangue em tubo Eppendorf e adicionar 900 µl solução TTKM1
(repetir este item ao redor de 2X, até que não hajam mais hemácias no precipitado).
Agitar suavemente até a lise das hemácias pelo triton. Centrifugar a 5000 rpm (5min, RT) e descartar o sobrenadante.
 2. Lavar o precipitado com 1ml solução TKM1 (retirada do triton), pipetando suavemente.
Centrifugar a 5000 rpm (5min, RT).
 3. Ressuspender o precipitado em 200µl de TKM2 e adicionar 20µl SDS 10%.
 4. Incubar à 65°C por 15 min.
 5. Adicionar 60µl NaCl 5M (precipitar proteínas). Aplicar vortex por 30 segundos
 6. Centrifugar à 12000 rpm (10 min, RT).
 7. Recuperar cuidadosamente o sobrenadante (desprezar o precipitado)
 8. Adicionar 2 volumes (~ 1ml) Etanol Absoluto invertendo tubo até precipitar DNA.
 9. Centrifugar à 13000 rpm (10 min, RT). Descartar o sobrenadante e lavar DNA precipitado com 500 µl Etanol 70%.
 10. Centrifugar novamente à 13000rpm (10 min, RT). Descartar sobrenadante e deixar precipitado secar (RT , 5 min , tubo invertido sobre papel filtro).

Ressuspender DNA em 100µl ddH2O ou TE (Tris-HCl 10 mM / EDTA 1mM, pH 8)

TKM1

	Concentração final	Para 1 litro
Tris-HCl , pH 7,6.....	10 mM	1.58 g
KCl	10 mM	0.75 g
MgCl	10 mM	0.95 g
EDTA	2 mM	4 mL

TTKM1

	Concentração final	Para 1 litro
Tris-HCl , pH 7,6.....	10 mM	1.58 g
KCl	10 mM	0.75
MgCl	10 mM	0.95 g
EDTA	2 mM	4 mL
Triton-X	0,27%	2.7 mL

TKM2

	Concentração final	Para 1 litro
Tris-HCl , pH 7,6.....	10 mM	1.58 g
KCl	10 mM	0.75 g
MgCl	10 mM	0.95 g
EDTA	2 mM	4 mL
NaCl	400 mM	23.40 g

ANEXO 2

Extração do DNA genômico por fenol clorofórmio

Protocolo Primeira Etapa:

- 1- Coleta de sangue em tubo contendo EDTA ou ACD;
- 2- Centrifugação por 10 minutos a 2500rpm;
- 3- Descarte do plasma com pipeta Pasteur descartável, em descarte com solução de hipoclorito, num Becker.;
- 4- Remoção dos glóbulos brancos (leucócitos) com pipeta Pasteur;
- 5- Transferência dos leucócitos para um tubo de polipropileno do tipo “Falcon” de 15ml;
- 6- Adição de tampão RSB 1X até completar o volume final de 11ml no tubo;
- 7- Adição de 60µl de NONIDET - P40 (TRITON ou IGEFAL) e homogeneização por 10 minutos;
- 8- Centrifugação a 2500rpm por 10 min e descarte do sobrenadante no descarte;
- 9- Ressuspensão do “pellet” em 0,5ml de tampão RSB 1X seguida de homogeneização;
- 10- Lise das hemácias com 3,0ml de sabão SDS;
- 11- Adição de 40 µL de proteinase K;
- 12- Levar à estufa por 2 - 3 horas à 37°C ou overnight;

Protocolo Segunda Etapa:

- 1- Adicionar 3,0 mL de fenol no tubo falcon.;
- 2- Homogeneização por 10 minutos, seguida de centrifugação a 2500 rpm por 10 min;
- 3- Remoção da porção superior do tubo (transparente), com pipeta Pasteur para outro tubo “Falcon”;
- 4- Adição de clorofórmio-álcool iso-amílico com fenol saturado (1:1) (1,5ml de clorofórmio e 1,5ml de fenol.saturado);

- 5- Homogeneização por 10 minutos e centrifugação por mais 10 minutos a 2500 rpm;
- 6- Remoção da porção inferior do tubo (fenol), com pipeta Pasteur, seguida de adição de 3.0ml de clorofórmio-álcool iso-amílico;
- 7- Homogeneização por 10 minutos e centrifugação por mais 10 minutos a 2500 rpm seguida de remoção completa da porção inferior do tubo;
- 8- Adição de 6.0ml de etanol absoluto gelado, para que haja a precipitação do DNA;
- 9- Manutenção do DNA precipitado a 4°C por 16 horas, seguida da remoção do DNA com uma pipeta e ressuspensão em 200 a 250µl de tampão TE;

Soluções empregadas

Para a realização das técnicas previamente descritas, foram utilizadas algumas soluções cujos protocolos encontram-se a seguir:

Para extração de DNA:

RSB 10X (500,0 mL):

Tris HCl pH 7,6; 0,1M	50,0 mL
KCl 0,1M	25,0 mL
MgCl 0,1M	50,0 mL
H ₂ O qsp	500,0 mL

RSB 1X (500,0 mL):

RSB 10X	50,0 mL
H ₂ O qsp	500,0 mL

SDS (solução para sangue) (500,0 mL):

RSB 1X	500,0 mL de RSB 10X
NaCl 0,4 M	40,0 mL de NaCl 5 M
SDS 0,5 %	12,5 mL de SDS 20 %
EDTA 20 mM	2,0 mL de EDTA 0,5 M

H₂O qsp 500,0 mL

TE 10X (200,0 mL):

Tris HCl pH 8,0 1,0mL

EDTA 0,2M 1,0 mL

H₂O qsp 200,0 mL

Autoclavar

Clorofórmio Álcool Isoamílico (25,0 mL):

Clorofórmio 24,0 mL

Álcool isoamílico 1,0 mL

Não autoclavar (guardar em geladeira)

EDTA pH 8 0,2M (100,0 mL):

PM = 372,24

EDTA 7,44 g

H₂O qsp 100,0 mL

Autoclavar

Tris/HCl 2M pH 7,5 < 8,0 (500,0 mL):

PM Tris = 121,1g V= volume em litros

M = m.V.PM PM = peso molecular

M = 2 . 0,5 . 121,1 M = quantidade final

M = 121,1g

Tris 121,1 g

H₂O qsp 500,0 mL

HCl 35,0 a 40,0 mL

Autoclavar

Tris/Hcl 0.5 M (500,0mL):

$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$

$2 \cdot V_1 = 0,5 \cdot 500$

$V_1 = 125 \text{ ml de Tris/HCl 2M}$

EDTA 0,5M (500,0 mL):

$$M = m \cdot V(e) \cdot PM$$

$$M = 0,5 \cdot 0,5 \cdot 372,24\text{g/mL}$$

$$M = 93,6\text{g de EDTA}$$

$$\text{EDTA} = 93,06\text{ g}$$

$$\text{H}_2\text{O qsp} = 500,0\text{ mL}$$

Autoclavar, pH 8,7.

Molaridade da solução (M): É a quantidade de mol do soluto dissolvido em 1 litro de solução.

$$M = n1/V \text{ ou } M = m1/ \text{mg1} \cdot V$$

Para acertar o pH das soluções:

NaOH: deixa a solução básica (maior ou igual a 7,0)

HCl: Deixa a solução ácida (menor ou igual a 4,0)

Fenol Saturado:

- Descristalizar o fenol em banho maria a 68° C;
- Em um becker de 2000mL, despejar o fenol já descristalizado e adicionar a solução Tris/Hcl 0,5M num volume final de 500mL;
- Agitar por 15 minutos no agitar magnético e esperar a separação das fases;
- Descartar a fase superior (Tris/Hcl);
- Adicionar Tris/Hcl 1M;
- Agitar por 15 minutos no agitar magnético e esperar a separação das fases;
- Verificar o pH da solução (7.8) com fita medidora;
- Se não obtiver o pH desejado, repetir o passo 5 em diante;
- Após obtido o pH adicionar 10% do volume total da solução de Tris/Hcl 1M;
- No frasco do fenol adicionar 0,1g de BME hidroxiquinolina para evitar oxidação da solução;
- Despejar o fenol de volta ao frasco e armazená-lo em geladeira 4°C.

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - ISCMSP - FCMSCSP

Título do protocolo de Pesquisa: " Análise da Associação entre Polimorfismos no Gene da Aldose Redutase e Suscetibilidade à Retinopatia Diabética "

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL.

1. NOME DO PACIENTE.:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO.....

BAIRRO:..... CIDADE

CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: NºAPTO

BAIRRO: CIDADE:.....

CEP: TELEFONE: DDD(.....).

Eu, _____, recebi explicações sobre a coleta de 5ml de sangue, para exame de laboratório relacionado a minha doença (diabetes e retinopatia diabética). Este exame tem o objetivo de investigar a minha tendência para o desenvolvimento de retinopatia diabética. Fui informado(a) que esta coleta não vai proporcionar nenhum desconforto adicional e que meu nome não será divulgado. Fui informado(a) também que eu, meus pais ou responsáveis teremos a qualquer momento as informações sobre os riscos e benefícios da pesquisa, para que não fique nenhuma dúvida. Neste caso, poderei entrar em contato com o pesquisador Flavio Richeti (biólogo) no telefone 3331-2008, no Departamento de Ciências Fisiológicas, todas as tardes. Caso eu não concorde com esta coleta, não ocorrerá nenhum prejuízo ao meu tratamento.

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

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do responsável legal

Flávio Richeti CRB 23.542/01-D

ANEXO 4



IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
APROVADO PELA CONEP/MS EM 30/04/97-REF: CNS/CARTA 32 DOC.
Rua Dr. Cesário Mota Júnior, 112 Santa Cecília CEP 01277900 São Paulo -SP
PABX (11) 32240122 Ramal: 5502 - Fax- Ramal: 5710 E-mail: eticamed@santacasasp.org.br

São Paulo, 21 de maio de 2003.

Projeto nº019/03
Informe este número para identificar
seu projeto no CEP

Ilmo.(a).Sr.(a)

Dr.(a). Flávio Richetti

Departamento de Ciências Fisiológicas

O Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP, reunido no dia **19/03/2003** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **“Análise da associação entre poliformismos no gene da aldose redutase e suscetibilidade à retinopatia diabética”**,emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

- ☒ **Aprovado, inclusive o TCLE**
- ☐ **Com pendência** modificações ou informação relevante a serem atendidas em 60 dias (enviar as alterações em duas cópias);
- ☐ **Retirado**, por não ser reapresentado no prazo determinado;
- ☐ **Não aprovado:** e
- ☐ **Aprovado** inclusive o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS -CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. **Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**


Prof. Dr. Daniel R. Muñoz
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
ISCMSP

ANEXO 5

Purificação da reação de seqüenciamento

1. Adicionar 50 µl de isopropanol 65% por amostra e homogeneizar.
2. Deixar em repouso por 20 minutos em local escuro.
3. Transferir o conteúdo para tubo de 1,5mL e centrifugar por 25 min a 14.000 rpm.
4. Desprezar sobrenadante com e adicionar 250 µl de etanol 60% (não homogeneizar).
5. Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm.
6. Desprezar sobrenadante e deixar o tubo secar aberto por 2 minutos a uma temperatura de 70°C, para evaporação do etanol residual.

ANEXO 6. Características clínicas dos pacientes pertencentes ao grupo de estudo

	ID (anos)	TD (anos)	ZIMC	DI (U/kg/dia)	PA Sistólica (mmHg)	PA Diastólica (mmHg)
Média (± DP)	10,64 (± 8,24)	16,10 (± 5,40)	0,02 (± 1,12)	0,99 (± 0,55)	114,72 (± 9,56)	75,19 (± 7,07)
Mediana	8,00	15,50	-0,09	0,85	116,00	77,00
Mín-Máx	0,90-35,00	10,00-38,00	-2,40-2,02	0,37-3,33	97,50-137,00	60,00-85,00
Total	64	64	41	41	44	44

ID = Idade do diagnóstico

TD = Tempo de Doença

ZIMC = Escore Z do Índice de Massa Corporal

DI = Dose de Insulina

PA = Pressão Arterial

ANEXO 7. Distribuição dos pacientes segundo o percentil da pressão arterial sistólica e diastólica e presença de complicações crônicas (HAS, neuropatia ou proteinúria).

	% PA Sistólica			% PA Diastólica			HAS	Neuropatia	Proteinúria	Complicações Crônicas
	<10	10-90	>90	<10	10-90	>90				
Frequência	9	35	0	4	40	0	0	4	16	18
Porcentagem	20,5	79,5	0,0	9,1	90,9	0,0	0,0	9,1	25,8	34,6
Total		44			44		44	44	62	52

% PA Sistólica = Percentil da pressão arterial sistólica

% PA Diastólica = Percentil da pressão arterial diastólica

HAS = Hipertensão Arterial Sistêmica

ANEXO 8 Nível da hemoglobina glicada expressa em valor acima do limite da normalidade

	HbAc (VALN-%)		
	<1	1-3	>3
Frequência	7	22	23
Porcentagem	13,5	42,3	44,2
Total	52	52	52

HbAc = Hemoglobina glicada

VALN = Valor Acima do Limite da Normalidade

ANEXO 9. Classificação dos pacientes segundo exame fundoscópico

	Fundo de Olho				
	Normal	RDNPL	RDNPM	RDNPG	RDP
Frequência	33	11	2	3	15
Porcentagem	51,6	17,2	3,1	4,7	23,4
Total	64	64	64	64	64

RDNPL = Retinopatia Diabética não Proliferativa Leve
 RDNPM = Retinopatia Diabética não Proliferativa Média
 RDNPG = Retinopatia Diabética não Proliferativa Grave
 RDP = Retinopatia Diabética Proliferativa

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIELLO LP, AVERY RL, ARRIG PG, KEYT BA, JAMPEL HD, SHAH ST, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl Med* 1994; 331(22):1480-7.
- AIELLO LP, GARDNER TW, KING GL, BLANKENSHIP G, CAVALLERANO JD, FERRIS FL. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 1998; 21:143-56.
- ALDER VA, SU EN, YU DY, CRINGE SJ, YU PK. Diabetic Retinopathy: early functional changes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24(9-10): 785-8.
- AMANO S, YAMAGISHI S, KODA Y, TSUNEOKA M, SOEJIMA M, OKAMOTO T, INAGAKI Y, YAMADA K, KIMURA H Polymorphisms of sorbitol dehydrogenase (SDH) gene and susceptibility to diabetic retinopathy. *Med Hypotheses*. 2003 Apr;60(4):550-1.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: clinical practice recommendations 2002. Report of the Expert Committee on the Diagnostic and Classification of Diabetes Mellitus.- *Diabetes Care* 2002; 25 (Suppl 1): S5-20.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: Clinical practice recommendations 2002. Diabetic Nephropathy. *Diabetes Care* 2002; 25(Suppl 1):S85-9.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: Clinical practice recommendations 2002. Diabetes Mellitus and exercise. *Diabetes Care* 2002; 25(Suppl 1): S64-8.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. From the American Diabetes Association *Diabetes Care* 2004 27:s5-s10.
- BAGNASCO S, BALABAN R, FALES HM, YANG YM, BURG M. Predominant osmotically active organic solutes in rat and rabbit renal medullas. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 5872-77.
- BAGNASCO SM, UCHIDA S, BALABAN RS, KADOR PF, BURG MB. Induction of aldose reductase and sorbitol in renal inner medullary cells by elevated extracellular NaCl. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; (84): 1718-20.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Estatísticas. [online] [citado 2003 Março 3]. Disponível em URL:http://www.portalweb01.saude.gov.br/saude/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_dseq_noticia=132
- BOELTER MC, AZEVEDO MJ, GROSS JL, LAVINSKY J. Fatores de risco para retinopatia diabética. *Arq Bras Oftalmol* 2003; 66:239-47.
- BOSCO A, LERÁRIO AC, SORIANO D, SANTOS RF, MASSOTE P, GALVÃO D, FRANCO ACHM, PURISCH S, FERREIRA AR. Retinopatia Diabética. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2005;49(2): 217-27.

BROWNLEE M, Biochemistry and molecular cells biology of diabetic complications. Nature 2001; 414(68650): 813-20.

CALLIARI L EP, DIB SA, CHACRA AR. Diagnóstico e prevenção do Diabetes Mellitus. Em: MONTE O, LONGUI CA, CALLIARI LEP – Endocrinologia para o pediatra. 2ed, São Paulo, Atheneu, 1998; p 75

CHUNG S, BROWN JM, PROVO JN, HOPKINS R, MCINTOSH MK. Conjugated linoleic acid promotes human adipocyte insulin resistance through NFkappaB-dependent cytokine production. J Biol Chem. 2005 Nov 18; 280(46): 38445-56. Epub 2005 Sep 9.

CIGNARELLI M, DE CICCO ML, DAMATO A, PATERNOSTRO A, PAGLIARINI S, SANTORO S. High systolic blood pressure increases prevalence and severity of retinopathy in NDDM patients. Diabetes care 1992; 15:1002-8.

CORMACK DH. Fundamentos de histologia. Rio de Janeiro Guanabara Koogan; 1996.p. 90-3

CRUICKSHANKS KJ, MOSS SE, KLEIN R, KLEIN BE. Physical activity and proliferative retinopathy in people diagnosed with diabetes before age 30 yr. Diabetes Care 1992; 15: 1267-72.

DAMICO DJ. Diseases of the retina. N. Engl. J Med 1994; 331: 95-106.

DCCT 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.

DCCT Research Group. Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. Diabetes 1997; 46:1829-39.

DEAN L, MCENTYRE JR. The Genetic Landscape of Diabetes [Internet]. National Library of Medicine (US), NCBI; 2004 Jun.

DEMAINE A, CROSS D, MILLWARD A. Polymorphisms of the Aldose Reductase Gene and Susceptibility to Retinopathy in Type I Diabetes Mellitus. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2000; 41(13): 4064-8.

DIB SA, Complicações Crônicas do Diabetes Mellitus. Em: MONTE O, LONGUI C A, CALLIARI LEP. Endocrinologia para o pediatra. 2ed, São Paulo, Atheneu, 1998; p 88-9.

DVORNIK D, SIMARD-DUQUESNE N, KRAMI M, SESTANJ K, GABBAY KH, KNOSHITA JH, VARMA SD, MEROLA LO. Polyol accumulation in galactosemic and diabetic rats: control by aldose reductase inhibitor. Science 182(117):1146 -48, 1973.

EARLY TREATMENT DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP: Ophthalmology; 98:823-833, 1991

FERRARIS JD, WILLIAMS CK, JUNG KY, BEDFORD JJ, BURG MB, GARCIA PA. ORE, a eukaryotic minimal essential osmotic response element . The aldose reductase gene in hyperosmotic stress. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:18318-21.

FERRIS III F L. Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* 16:322-5, 1993

FORRESTER JV, KNOTT RM. Pathogenesis of diabetic retinopathy and cataract. In: Pickup JC, Williams G, *Textbook of diabetes* 2 ed. Oxford: Blackwell Science; 1997.p 45.

FRANK RN. Diabetic Retinopathy. *N Engl J Med.* 2005;350: 48-58.

FRANK RN, KEIRN RJ, KENNEDY A, FRANK KW: Galactose – induce retinal capillary basement membrane thickening: prevention by sorbinil. *Invest Ophthalmol Visual Sci* ,1983; 24(11): 1519 – 24.

GONZALEZ-CLEMENTE JM, GIMENEZ-PEREZ G, RICHART C, BROCH M, CAIXAS A, MEGIA A, GIMENEZ-PALOP O, SIMON I, MAURICIO D, VENDRELL J. The tumour necrosis factor (TNF)-alpha system is activated in accordance with pulse pressure in normotensive subjects with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 2005 Nov;153(5):687-91.

GRAHAM A, HEATH P, MORTEN JE, MARKHAM AF – The human aldose reductase gene maps to chromosome 7q35. *Human Genet*, 1991; 86(5): 509-514.

GUYTON, AC & HALL JE – *Insulina Glucagon e Diabete Melito. Em: Tratado de Fisiologia Médica.* 10 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002, p 836.

HANIS CL & HALLMAN M. Genetic of Diabetic Retinopathy. *Current Diabetes Report.* 2006; 6: 155-61.

HEEGAND S. Morphology of the vitreoretinal bander region. *Acta Ophthalmol Scand* 1997; 222; 1-31.

HEESOM AE, HIBBERD ML, MILLWARD BA, et al. A Polymorphism at the 5' end of the aldose reductase gene is strongly associated with the development of diabetic nephropathy in Type I Diabetes. *Diabetes*, 1997; 46(2):287-291.

HIRSCHI KK, D'AMORE PA. Control of angiogenesis by the pericyte, molecular mechanisms and significance. *EXS* 1997;79: 419-28.

IKEGISHI Y, TAWATA M, AINDA K, ONAYA T. Z-4 Allele Upstream of the aldose reductase gene is associated with proliferative retinopathy in Japanese patients with NDDM, and elevated luciferase gene transcription in vitro. *Life Sciences*: 1999; Vol 65(20): No 20: 2061-70

IMESCH PD, BINDLEY CD , WALLOW IHL. Clinicopathologic correlation of intraretinal microvascular abnormalities. *Retina* 1997; 17(4) ; 321-9.

ISHIBASHI T, INOMATA H, Ultrastructure of retinal vessels in diabetic patients. *Br J Ophthalmol* 1993; 77(9); 574-8.

ICHIKAWA F, YAMADA K, ISHIYAMA SS, YUAN X, NONAKA K. Association of an (A-C)_n dinucleotide repeat polymorphic marker at the 5'-region of the aldose reductase gene with retinopathy but not with nephropathy or neuropathy in Japanese patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1999 Sep;16(9):744-8.

JANKA HU, WARRAM JH, RAND LI, KROLEWSKI AS. Risk factor for progression of background retinopathy in long-standing IDDM. *Diabetes* 1989;38 (4):460-4.

KADOR PF, AKAGI Y, TAKAHASHI Y, IKEBE H, WYMAN M, KINOSHITA JH. Prevention of retinal vessel changes associated with diabetic retinopathy in galactose fed dogs by aldose reductase inhibitors. *Arch Ophthalmol*: 1990; 108(9): 1301 – 09

KADOR PF, AKAGI Y, TERUBAYASHI H, WYMAN M, KINOSHITA JH. Prevention of pericyte ghost formation in retinal capillaries of galactose – fed dogs by aldose reductase inhibitors. *Arch Ophthalmol*: 1988; 106(8):1099 – 102.

KAO YL, DONAGHUE K, CHAN A et al. A novel polymorphism in the aldose reductase gene promoter region is strongly associated with diabetic retinopathy in adolescents with Type I Diabetes. *Diabetes*: 1999; 48(6): 1338-1340.

KENN H, LEE ET, RUSSEL D, MIKI E, BENNETT PH, LU M, et al. The appearance of retinopathy and progression to proliferative retinopathy: the WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia*: 2001; 44(suppl 2) S22-30.

KINOSHITA JH. Mechanisms initiating cataract formation: Proctor lecture. *Invest Ophthalmol*: 1974; 13(10): 713-14.

KLEIN R, KLEIN BE, MOSS SE, DAVIS ME, DEMETS, DL. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy II. Prevalence and risk factors of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol*: 1984; 102: 520-6.

KLEIN R, KLEIN BE, MOSS SE, CRUICKSHANKS KJ. The Wisconsin epidemiological study of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1994; 112(9):1217-28.

KLEIN R, KLEIN BE, MOSS SE, CRUICKSHANKS KJ. Relationship of hyperglycemia to the long-term incidence and progression of diabetes retinopathy. *Arch Intern Med*: 1994 ;154(19):2169-78.

KLEIN R, KLEIN BEK, MOSS SE, CRUICKSHANKS KJ. The Wisconsin epidemiologic study of diabetes retinopathy (WESDR) XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type I diabetes [commented on *Ophthalmology* 1998; 105:1799 – 80]. *Ophthalmology* 1998; 105(10):1801 – 15.

KO CB, LAN KSL, WAT NMS et al. An AC(n) dinucleotide repeat polymorphic marker at the 5' end of the aldose reductase gene is associated with early onset diabetic retinopathy in NIDDM patients. *Diabetes*: 1995; 44:727-32.

KO CB, RUEPP B, BOHREN KM, GABBAY H, CHUNG SM. Identification and characterization of multiple osmotic response sequences in the human aldose reductase gene. *The Journal of Biological Chemistry*: 1997; 272(26): 16431-7.

KOYA D, KING GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*: 1998; 47(6): 859-66.

KROLEWSKI AS, WARRAM JH, HAND LI, CHISTLIEB AR, BUSICK EJ, KAHN CR. Risk of proliferative diabetic retinopathy in juvenile-onset type I diabetes: a 40-yr follow-up study. *Diabetes Care*: 1986; 9(5): 443-52.

KULLBERG CE, ARNQVIST HJ. Good blood glucose control characterizes patients without retinopathy after long diabetes duration. *Diabet Med* 1994; 12(4):314-20.

KUMARAMANICKAVEL G, SRIPRIYA S, VELLANKI RN, et al. Inducible nitric oxide synthase gene and diabetic retinopathy in Asian Indian patients. *Clinical Genetics* 2002, 61(5):344-348.

LAAKSO M. Benefits of strict glucose and blood pressure control in type 2 diabetes: lessons from the UK prospective diabetes study. *Circulation* 1999; 99(4):461-2.

LI Q, XIE P, HUANG J, GU Y, ZENG W, SONG H. Polymorphisms and functions of the aldose reductase gene 5' regulatory region in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Chinese Medical Journal*: 2002; 115(2): 209-13.

LI W, KHATAMI M, ROCKEY JH. The effect of glucose and an aldose reductase inhibitor on the sorbitol content and collagen synthesis of bovine retinal capillary pericytes in culture. *Exp eye res*: 1985; 40(3): 439 – 44.

MALIK RA, LI C, AZIZ W, OLSON JA, VOHRA A, MCHARDY KC, FORRESTER JV, BOULTON AJ, WILSON PB, LIU D, MCLEOD D, KUMAR S. Elevated plasma CD105 and vitreous VEGF levels in diabetic retinopathy. *J Cell Mol Med*. 2005 Jul-Sep;9(3):692-7.

MASHARANI U & KARAM JH. Pancreatic Hormones & Diabetes Mellitus In: GREENSPAN FS, GARDNER DG. *Basic Clinical Endocrinology*, 6 th ed, San Francisco, Lang Medical: 2001; 18: 623-98.

MCGOWAN MH, IWATA T, CARPER DA. Characterization of the mouse aldose reductase gene and promoter in a lens epithelial cell line. *Molecular Vision* 1998 ;4:2.

MEI Z, GRUMMER-STRAWN LM, PIETROBELLI A, GOULDING A, GORAN MI, DIETZ WH. Validity of body mass index compared with other body-composition screening indexes for the assessment of body fatness in children and adolescents. *American Journal of Clinical Nutrition* 2002; 75:97-985

MIKI E, LU M, LEE ET, KEEN H, BENNETT PH, HUSSEL D. The incidence of visual impairment and its determinants in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia*: 2001; 44 (Suppl 2) S31-6.

MIZISIN AP, POWELL HC. Schwann cell injury is attenuated by aldose reductase inhibition in galactose intoxication. *J. Neuropathol Exp Neurol*: 1993; 52:78 – 86.

MOSS SE, KLEIN BE. Association of cigarette smoking with diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 1991; 14:119-26.

MOSS SE, KLEIN BE. Cigarette smoking and ten year progression of diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 1996; 103: 1438-42

MOSS SE, KLEIN R, KLEIN BE. The association of alcohol consumption with the incidence and progression of diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 1994; 101: 1962-8.

MURATA T, NAKAGAWA K, KHALIL A, ISHIBASHI I, INOMATA H, SUEISHI K. The relation between expression of vascular endothelial growth factors and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas. *Lab Invest* 1996; 74(4): 819-25.

NISHIKAWA T, EDELSTEIN D, BROWNLEE M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney int Suppl*: 2000; 58: S26-S30. Review.

OLMOS P, FUTERS S, ACOSTA AM, SIEGEL S, MAIZ A, SCHIAFFINO R, MORALES P, DIAZ R, ARRIAGADA P, CLARO JC, VEJA R, VOLLRATH V, VELASCO S, EMMERICH M. (AC)23 [Z-2] polymorphism of the aldose reductase gene and fast progression of retinopathy in chilean type 2 diabetics. *Diabetes Research and Clinical Practice*: 2000; 47(3): 169-76.

ORCHARD TJ, DORMAN JS, MASER RE, BECKER DJ, ELLIS D, LAPORTE RE. Factors associated with avoidance of severe complications after 25 yr of IDDM. *Diabetes Care* 1990; 13:741-7.

PAILHOUX E, VEYSSIERE G, FABRE S, TOURNAIRE C, JEAN C. The genomic organization and DNA sequence of the mouse *vans deferens* androgen regulated protein gene. *J. Steroid Biochem Mol. Biol.* 1992; 42 (6): 561-8

PARK HK, AHN CW, LEE GT, KIM SJ, SONG YD, LIM SK, KIM KR, HUH KB, LEE HC. (AC) n polymorphism of aldose reductase gene and diabetic microvascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*: 2001; 55(2): 151-57.

PETROVIC MG, PETERLIN B, HAWLINA M, PETROVIC D Aldose reductase (AC)n gene polymorphism and susceptibility to diabetic retinopathy in Type 2 diabetes in Caucasians. *J Diabetes Complications*. 2005 Mar-Apr;19(2):70-3.

PINHEIRO CR. Retinopatia diabética. Em: LIMA J G, NÓBREGA L H C, NÓBREGA M L L. *Aulas em endocrinologia*. São Paulo, Atheneu, 2001 p.171-180.

POLAK M, NEWFIELD RS, FIORETTO P, CZERNICHOW P, MARCHASE R. Pathophysiology of diabetes complications. *Diabetologia* 1997; 40:B65-7.

RESNIKOFF S, PASCOLINI D, ETYA'ALE D, KOCUR I, PARARAJASEGARAM R, POKHAREL GP, MARIOTTI SP Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ*. 2004, 82(11):844-51.

ROBINSON WG, KADOR PF, KINOSHITA JH. Retinal capillaries: basement membrane thickening by galactosemia prevent with aldose reductase inhibitor. *Science*: 1983; 221: 1177 – 79.

ROBINSON WG, NATATA M, LAVER N, HOHMAN TC, KINOSHITA JH. Diabetic like retinopathy in rats prevent with na aldose reductase inhibitor. Invest Ophthamol Visual Sci: 1989; 30: 2285- 92.

ROSENBLAT BJ, BENSON WE. Diabetic Retinopat. In: Ophtalmology, 2 edition. Mosby, St Louis, MO. Editors: Myson Yanoff & Joy S. Duken: 2004.

SANTOS KG, TSCHIEDEL B, SCHNEIDER J, SOUTO K, ROISENBERG I. Diabetic retinopathy in euro-brazilian type 2 diabetic patients: relationship with polymorphism in the aldose reductase, the plasminogen activator inhibitor-1 and the methylenetetrahydrofolate reductase genes. Diabetes Research and Clinical Practice: 2003; 61(2): 133-36.

SCHELLINI SA, MORAES SILVA MRB, MORAES SILVA MA. Diabetes, retinopatia diabética e cegueira. J.Bras Med: 1994; 67: 171-4.

SCHODER S, BRAND M, SCHIMID SGW, REIM M, SCHIMID SH. Microvascular network topology of the human retinal vessels. Fortschr Ophthalmol 1990; 87(1); 52-8.

SESTI G, SCIAQUA A, CARDELLINI M, MARINI MA, MAIO R, VATRANO M, SUCCURRO E, LAURO R, FEDERICI M, PERTICONE F. Plasma concentration of IGF-I is independently associated with insulinsensitivity in subjects with different degrees of glucose tolerance.Diabetes Care. 2005 Jan; 28(1):120-5.

SHAH VO, SCAVINI M, NIKOLIC J, SUN Y et al. Z-2 microsatellite allele is linked to increased expression of the aldose reductase gene in diabetic nephropathy. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.1998; 83(8):2886-91.

SHICHIRI M, KISHIKAWA H, OHKUBO Y, WAKE N, Long term results of the Kumamoto studs on optimal diabetes control in type 2 diabetic patients. Diabetes Care 2000; 23(Suppl 2):B21-9.

SIVENIUS K, NISKANEN L, VOUTILAINEN-KAUNISTO R, LAAKSO M, UUSITUPA M Aldose reductase gene polymorphisms and susceptibility to microvascular complications in Type 2 diabetes.Diabet Med. 2004 Dec;21(12):1325-33.

SPEICHER MA, DANIS RP, CRISWELL M, PRATT L. Pharmacologic therapy for Diabetic Retinopat. Expert Opin Emerg Drugs: 2003; 8(1):239-250.

STEPHENS JW, DHAMRAIT SS, COOPER JA, ACHARYA J, MILLER GJ, HUREL SJ, HUMPHRIES SE. The D allele of the ACE I/D common gene variant is associated with Type 2 diabetes mellitus in Caucasian subjects. Mol Genet Metab. 2005 Jan;84(1):83-9.

STRATTON IM, ADLER AI, NEIL HA MATTHEWS DR, MANLEY SE, CULL CA, et.al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes.(UKPDS 35) prospective observational study [comment on BMJ 2000;321(7258):405-12.

TANAKA Y, KATOH S, HORI S, MIURA M, YAMASHITA H. Vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. Lancet 1997; 349(9064):1520.

TSILIBARY EC. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. *J.Pathol* 2003 (4); 537-46.

WANG K, BOHREN KM, GABBAY KH. Characterization of the human aldose reductase gene promoter. *The journal of Biological Chemistry*. 1993; 268 (21):16052-8.

WANG Y, NG M, LEE S C, SO WY, TONG P, COCKRAM C, CRITCHLEY J, CHAN, J. Phenotypic heterogeneity and associations of two aldose reductase gene polymorphisms with nephropathy and retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003 Aug; 26 (8):2410-5.

WILKINSON CP, FERIS FL, KLEIN RE, LEE PP, AGARDH CD, DAVIS M, DILLS D, KAMPIK A, PARARAJASEGARAM R, VERDAGUER JT. The global Diabetic Retinopathy project group: Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*: 2003; 110(9):1677 – 82.

WILLARS GB, TOWNSEND J, TOMLINSON DR, COMPTON AM, CHURCHILL RD. Studies on peripheral nerve and lens in long term experimental diabetes: effects of the aldose reductase inhibitor statil. *Metabolism*: 1988; 37(5): 442-49.

YAMAMOTO T, SATO T, HOSOI M, YOSHIOKA K, TANAKA S, TAHARA H, and NISHIZAWA Y, FUJII S: Aldose reductase gene polymorphism is associated with progression of diabetic nephropathy in Japanese patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes, obesity and metabolism*: 2003; 5(1): 51-7.

YANOFF M. Diabetic Retinopathy. *New England Med*. 1966 Jun; 274(24):1344-9.

YOKOYAMA H, TAHARA H, EMOTO M, FUJIWARA S, ARAKI T, SHINOHARA K, HATSUDA S, MAENO T, SHOJI T, KOYAMA H, SHOJI T, NISHIZAWA Y. The K469E polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene is associated with plasma fibrinogen level in type 2 diabetes. *Metabolism*. 2005 Mar; 54(3):381-6.

YOSHIOKA K, YOSHIDA T, TAKAKURA Y, UMEKAWA T, KOGURE A, TODA H, YOSHIKAWA T. Relation between polymorphisms G1704T and G82S of rage gene and diabetic retinopathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Intern Med*. 2005 May; 44(5): 417-21.

RESUMO

Dentre as complicações crônicas causadas pelo Diabetes Mellitus (DM), a retinopatia diabética (RD) é uma das mais importantes, considerada, em brasileiros, a segunda causa de cegueira irreversível em adultos. Apesar do tempo do diabetes e do controle glicêmico inadequado serem importantes fatores de risco para o desenvolvimento da retinopatia diabética, cada vez mais é reconhecido o envolvimento de fatores genéticos na etiologia desta complicação. Dentre as variações gênicas avaliadas em pacientes com RD ressaltam-se dois polimorfismos localizados no promotor do gene que codifica a enzima aldose redutase (ALR2), associados, em algumas populações, à suscetibilidade ou até mesmo à proteção ao desenvolvimento da RD. O objetivo deste estudo foi determinar a frequência dos polimorfismos C-106T e (AC)_n no gene ALR2 em pacientes brasileiros portadores de diabetes tipo 1 com e sem retinopatia e correlacionar os polimorfismos encontrados com a suscetibilidade ao desenvolvimento de retinopatia diabética. Foram avaliados 64 pacientes portadores de DM tipo 1, provenientes da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (SP) e Universidade Estadual de Campinas (SP), com no mínimo 10 anos de doença, subdivididos em: grupo 1, sem alteração no fundo de olho, grupo 2, portadores de retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) e grupo 3, portadores de retinopatia diabética proliferativa (RDP). O polimorfismo (AC)_n foi avaliado por meio de PCR e genotipagem automatizada e o polimorfismo C-106T foi avaliado por meio de PCR seguida de digestão enzimática. Não foi observada correlação entre o polimorfismo C-106T e o desenvolvimento de RD nesses pacientes ($p=0,153$), porém, em relação ao polimorfismo (AC)_n, o alelo Z (24 repetições AC) demonstrou-se significativamente associado ao desenvolvimento da complicação ($p=0,014$), tendo sido observada uma frequência de alelos semelhante à relatada em outras populações. Nesta amostra da população brasileira de pacientes com DM1, a presença do alelo Z pode ser considerada como fator de risco para o desenvolvimento de retinopatia diabética.

ABSTRACT

Diabetic retinopathy (DR) is one of the most important microvascular complications in both type 1 and type 2 diabetes (DM1 and DM2). In Brazil, its proliferative form is the second cause of irreversible blindness among adults of working age. Despite the strong association of DR with duration of the disease and degree of chronic hyperglycemia, genetic predisposition has been recognized as a possible trigger in the development of this complication. Recent studies have demonstrated that the development of DR in patients with type 1 diabetes is associated with the occurrence of polymorphisms located at the promoter of the aldose reductase gene (ALR2). There are no reports investigating these polymorphisms in DM1 Brazilian patients. The aim of this study was to investigate the relationship between the AC(n) repeat and C(-106)T polymorphisms of the ALR2 gene with the susceptibility to the development of DR in Brazilian patients with type 1 diabetes. Sixty four patients with at least 10 years of duration of diabetes, from Santa Casa de São Paulo and State University of Campinas, were consecutively selected. The study group was divided into: group 1, patients with no evidence of diabetic retinopathy, group 2, patients with non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) and group 3, patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR), confirmed by fundoscopy. The AC(n) microsatellite region was evaluated through PCR and automated genotyping and the C(-106)T substitution through PCR/RFLP. When each allele of the AC(n) polymorphism was evaluated, the Z allele (24 repeats) was significantly associated with the development of PDR ($p=0.014$). The C allele of the C(-106)T substitution, wasn't associated with the susceptibility to this microvascular complication ($p=0.153$). In our sample of Brazilian patients with DM1, the presence of the AC(n) polymorphism Z allele may be considered as risk factor for the development of DR. The C allele of the C(-106)T polymorphism is not associated with the development of DR.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)