



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

RAYNER ANDERSON FERREIRA DO NASCIMENTO

**RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES *VDR* E *MTHFR*,
MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO E
PARÂMETROS CLÍNICOS COM A OCORRÊNCIA DE RETINOPATIA EM
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

JOÃO PESSOA

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

RAYNER ANDERSON FERREIRA DO NASCIMENTO

**RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES *VDR* E *MTHFR*,
MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO E
PARÂMETROS CLÍNICOS COM A OCORRÊNCIA DE RETINOPATIA EM
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Darlene Camati Persuhn

JOÃO PESSOA

2015

N244r Nascimento, Rayner Anderson Ferreira do.
Relação entre polimorfismos nos genes VDR e MTHFR, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo e parâmetros clínicos com a ocorrência de retinopatia em diabetes mellitus tipo 2 / Rayner Anderson Ferreira do Nascimento.- João Pessoa, 2015.
85f. : il.
Orientadora: Darlene Camati Persuhn
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN
1. Diabetes mellitus tipo 2. 2. MTHFR. 3. Retinopatia diabética. 4. VDR.

UFPB/BC

CDU: 616.379-008.64(043)

Dissertação de Mestrado avaliada em 26 de fevereiro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Darlene Camati Persuhn
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Naila Francis Paulo de Oliveira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Interna

Prof^ª. Dr^ª. Tatiane Santi Gadelha
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Interna (suplente)

Prof. Dr. Alexandre Sérgio Silva
Programa Associado de Pós-graduação em Educação Física UPE/UEPB
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo

Prof. Dr. João Modesto Filho
Departamento de Medicina Interna
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo (suplente)

DEDICATÓRIA

À Deus, por ser a fonte de todo o conhecimento, sabedoria, pureza e amor; por compartilhar conosco esses e outros atributos através da sua graça e por nos inspirar à buscar um mundo mais justo.

“Porque o Senhor dá a sabedoria; da sua boca procedem o conhecimento e o entendimento”

(BÍBLIA, Provérbios 2.6).

“Há ouro e abundância de pedras preciosas, mas os lábios do conhecimento são joia de grande valor” (BÍBLIA, Provérbios 20.15).

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) nas pessoas dos professores Eleonidas Moura Lima (coordenador na gestão anterior) e Tatiane Santi Gadelha (coordenadora na gestão atual) e da secretária Anne Ludmilla Maul de Souza.

À professora Dr^a. Darlene Camati Persuhn pela oportunidade, confiança e sobretudo pelos ensinamentos que transcende a vida acadêmica.

Aos servidores do Departamento de Biologia Molecular da UFPB.

À coordenação e demais funcionários do Centro de Oftalmologia (CEROF) do Hospital Universitário Lauro Wanderley pela acolhida e presteza.

Aos queridos colaboradores Dr^a Cecília Neta Alves Pegado Gomes, Dr^a. Isabella Wanderley de Queiroga Evangelista, Dr. João Modesto Filho, Dr. Alexandre Sérgio Silva que generosamente deram suas preciosas contribuições para a realização deste trabalho.

Aos colegas Mayara Karla dos Santos Nunes, Antônio Raphael Cavalcanti e Thaynara Amaral Leite e tantos outros que deram relevante contribuição na execução do trabalho e com os quais compartilhei momentos gratificantes.

Aos colegas da turma 2013.1 do mestrado pelo convívio e solidariedade sobretudo durante as disciplinas além da amizade que estou certo que perdurará.

À todos os professores do PPGBCM em especial àqueles que gentilmente cederam seus laboratórios para realização de experimentos do projeto em muitos momentos.

À Jordana Rafaele pelo apoio, compreensão e orações.

À minha família, em especial à minha avó Josefa Ana, por me apoiarem em todas as decisões e fornecer a estrutura para o meu desenvolvimento pessoal.

À CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

E finalmente, meus sinceros agradecimentos à todos os pacientes que gentilmente acreditaram e aceitaram participar deste trabalho.

RESUMO

A retinopatia diabética (RD) constitui importante causa de cegueira adquirida entre diabéticos. Fatores clínicos estão relacionados ao risco para RD, em adição, diversos marcadores genéticos têm sido investigados, dentre eles, polimorfismos do *MTHFR* e *VDR*. Atividade defeituosa desses genes podem atenuar mecanismos implicados na patogenia da RD, no entanto, o impacto dos polimorfismos rs1801131 e rs1801133 ainda é inconclusivo, enquanto que para o rs1544410 há uma escassez de estudos na literatura. Neste trabalho a relação dos polimorfismos rs1801131, rs1801133 e rs1544410 com RD foi investigada por meio de estudo transversal em amostra de 109 indivíduos com tempo de duração de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) entre 5 e 10 anos. Após avaliação oftalmológica foi constituído um grupo de 40 afetados e 69 não afetados por RD. DNA genômico foi extraído de células bucais. Os dados genéticos foram obtidos por PCR-RFLP e analisados utilizando o teste exato de Fisher. Coleta de sangue e urina para determinações de marcadores metabólicos foi feita em 62 indivíduos e as médias dos valores foram comparados à distribuição alélica e genotípica do rs1544410. Não houve associação entre alelos ou genótipos dos polimorfismos rs1801131 e rs1801133 com RD. O alelo *b* e o grupo genotípico *Bb+bb* do rs1544410 foram mais frequentes no grupo de afetados apresentando leve significância: [OR 0.5 (95% IC 0.31-0.98) p=0,0478] e [OR 3.4 (95% IC 1.07-10.9) p=0,496] respectivamente. Nenhuma das variáveis clínicas estiveram associadas com rs1544410 embora uma tendência para valores maiores de proteína C-reativa em portadores do alelo *b* tenha sido identificada mas sem significância estatística. Em conclusão este estudo sugere que na amostra estudada o polimorfismo rs1544410 do *VDR* esteve relacionado ao risco de RD, mas não o rs1801131 e rs1801133 do *MTHFR*.

Palavras-chave: diabetes mellitus tipo 2; *MTHFR*; retinopatia diabética; *VDR*.

ABSTRACT

Diabetic retinopathy (DR) is an important cause of acquired blindness among diabetics. Clinical factors are related to the risk for DR, in addition, genetic markers have been investigated, among them *VDR* and *MTHFR* polymorphisms, however, the impact of rs1801131 and rs1801133 polymorphisms is still inconclusive, while for rs1544410 there is a shortage in the literature. In this work the relationship of polymorphisms rs1544410, rs1801131 and rs1801133 with DR was investigated by cross-sectional study in a sample of 109 individuals with type 2 diabetes (T2DM) duration between 5 and 10 years. After ophthalmological screening a group of 40 affected and 69 unaffected by DR was composed. Genomic DNA was extracted from buccal cells. Genetic data were obtained by PCR-RFLP and analyzed using Fisher's exact test. Blood sample and urine for metabolic markers determinations were obtained in 62 subjects and the mean values were compared to the allele and genotype distribution of rs1544410. There was no association between alleles or genotypes of polymorphisms rs1801131 and rs1801133 with RD. The polymorphic allele *b* and genotypic group *Bb* + *bb* of rs1544410 were more frequent in the affected group with mild significance: [OR 0.5 (95% CI 0.31-0.98) $p = 0.0478$] and [OR 3.4 (95% CI 1.07-10.9) $p = 0.496$], respectively. None of the clinical variables were associated with rs1544410 although a trend towards higher values of C-reactive protein in patients allele *b* has been identified but not statistically significant. In conclusion, this study suggests that the sample investigated rs1544410 polymorphism of the *VDR* was related to the risk of DR, but not rs1801131 and rs1801133 *MTHFR* polymorphisms.

Keywords: diabetic retinopathy; *MTHFR*; type 2 diabetes; *VDR*.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE	<i>Advanced glycation end products</i> (produtos finais de glicação avançada)
CAT	Capacidade antioxidante total
DAG	D-1,2-diacilglicerol
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus do tipo 1 (sigla em inglês: T1DM)
DM2	Diabetes mellitus do tipo 2 (sigla em inglês: T2DM)
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutathiona reduzida
HA	Hipertensão arterial
HbA _{1c}	Hemoglobina glicosilada
Hci	Homocisteína
HDL	<i>High density lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidade)
HHci	Hiperhomocisteinemia
IMC	Índice de massa corporal
kDa	<i>kilodaltons</i> (unidade de peso molecular)
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> (lipoproteína de baixa densidade)
MDA	Malondialdeído
MTHFR	5,10-metileno tetraidrofolato redutase (enzima)
<i>MTHFR</i>	Gene que codifica a MTHFR
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato
OR	<i>Odds ratio</i> (razão de chances)
pb	Pares de base (de nucleotídeos)
PCR	Proteína C-reativa
PCR-RFLP	Sigla em inglês para a fusão das técnicas de “reação em cadeia da polimerase” e “polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição”
PKC	<i>Protein kinase C</i> (proteína cinase C)
RAGE	Receptor de AGE
RD	Retinopatia diabética
RDNP	Retinopatia diabética não-proliferativa
RDP	Retinopatia diabética proliferativa
VDR	<i>Vitamin D receptor</i> (receptor de vitamina D)
<i>VDR</i>	Gene que codifica o VDR

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.	Oftalmoscopia do fundo de olho na RD	7
Fig. 2.	Resumo do metabolismo da homocisteína	15
Fig. 3.	Síntese e metabolismo da vitamina D	20
Fig. 4.	Visualização de genótipos em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Classificação da retinopatia diabética	7
------------------	--	---

LISTA DE TABELAS (DISSERTAÇÃO)

Tabela 1.	Caracterização antropométrica, clínica, bioquímica e metabólica da população estudada	32
Tabela 2.	Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos estudados entre os grupos	33
Tabela 3.	Variáveis bioquímicas entre os genótipos do rs1544410 (<i>BsmI</i>)	34

LISTA DE TABELAS (ARTIGO)

Tabela 1.	Caracterização antropométrica, clínica, bioquímica e metabólica da população estudada	45
Tabela 2.	Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1544410 entre os grupos RD e sem RD	46
Tabela 3.	Variáveis bioquímicas entre os genótipos do rs1544410 (<i>BsmI</i>)	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Diabetes Mellitus	3
2.1.1. Epidemiologia e classificação	3
2.1.2. Complicações vasculares na diabetes	4
2.1.3. Retinopatia diabética	6
2.1.3.1. Fatores de risco.....	8
2.1.3.2. Fisiopatologia.....	10
2.1.4. Mecanismos bioquímicos para efeito da hiperglicemia	11
2.1.4.1. Formação de AGEs	11
2.1.4.2. Via do poliol	12
2.1.4.3. Ativação da PKC	12
2.1.4.4. Estresse oxidativo	13
2.2. A Hiperhomocisteinemia	14
2.2.1. O gene da metilenotetrahydrofolato redutase (<i>MTHFR</i>)	16
2.2.2. Polimorfismo rs1801131	16
2.2.3. Polimorfismo rs1801133	17
2.3. Vitamina D	19
2.3.1. Metabolismo da vitamina D	19
2.3.2. O gene do receptor de vitamina D (<i>VDR</i>)	20
2.3.3. Polimorfismo rs1544410	22
2.4. Justificativa	24
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO	35
7. ARTIGO	38
8. CONCLUSÕES	55
9. REFERÊNCIAS	56
ANEXO A - Parecer de aprovação do projeto de pesquisa (CEP-HULW 796.459/14).....	71
ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido	74

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) tem emergido como epidemia mundial e a sua prevalência na população se encontra em curva ascendente, não havendo perspectiva de mudança de direção para as próximas décadas. Consiste em uma das maiores causas de morte e hospitalização, causando significativos gastos aos órgãos de saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). A retinopatia diabética (RD) é um importante agravo do diabetes e a sua progressão implica em uma série de danos à qualidade de vida do paciente que pode culminar em perda total ou parcial da visão (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014).

O desenvolvimento das técnicas moleculares tornou possível o estudo dos mecanismos e também a investigação de fatores genéticos responsáveis pela predisposição para doenças, em especial as de natureza multifatorial ou complexa. A identificação destes fatores pode auxiliar na escolha do tratamento, e prever o risco de futuras complicações, a exemplo da RD, constituindo um passo para a medicina personalizada (PETROVIČ, 2013).

O receptor de vitamina D (VDR) é um ativador de transcrição localizado no núcleo celular (ANDRUKHOVA et al., 2014). É o efetor central das ações da vitamina D no organismo com impacto em vários processos fisiológicos a exemplo do metabolismo do cálcio e fosfato, metabolismo insulínico, modulação de processos proliferativos, de diferenciação celular e do sistema imune, desta forma, alterações no VDR podem ter potencial de acarretar desequilíbrios fisiológicos que por sua vez possam contribuir para instalação de processos patológicos diversos (CHEN et al., 2014). Vários estudos têm investigado o impacto de polimorfismos do VDR em diversas condições patológicas tais como: síndrome metabólica (AL-DAGHRI et al., 2014a), obesidade (AL-DAGHRI et al., 2014b), carcinoma hepatocelular (FALLETI et al., 2010), lúpus eritematoso (LUO et al., 2012), caquexia (PUNZI et al., 2012) e etiologia da diabetes (ZHANG et al., 2012). Por outro lado registra-se poucos estudos na literatura que investiguem a sua relação com RD (BUCAN et al., 2009; CAPOLUONGO et al., 2006; CYGANEK et al., 2006) e nenhum deles na população brasileira.

A hiperhomocisteinemia (HHci) está estabelecida como fator de risco para complicações macrovasculares (STANGER et al., 2001; CLARKE et al., 2012; MA et al., 2014) e seu impacto nas complicações microvasculares no diabetes tem sido investigado (SCHALINSKE; SMAZAL, 2012; BARBIERI et al., 2014). A relação entre HHci e a RD ainda permanece inconclusiva, embora estudos pontuais tenham encontrado associação

(KAYADIBI et al., 2014; MALAGUARNERA et al., 2014, XU et al., 2014). A 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) é uma enzima envolvida no processo de conversão da homocisteína (Hci) em metionina e portanto tem implicação direta com os seus níveis plasmáticos (SCHALINSKE; SMAZAL, 2012). Foi demonstrado que o polimorfismo rs1801133 pode diminuir a atividade da enzima e conseqüentemente elevar a Hci no plasma (FROSST et al., 1995). O polimorfismo rs1801131 está localizado no domínio regulatório da MTHFR e as evidências a respeito do seu impacto sobre a HHci são controversas (NAGELE et al 2011; WEISBERG et al., 2001). Os dois polimorfismos têm sido estudados na RD, mas resultados controversos são observados em diferentes populações (ERRERA te al., 2006; NIU et al., 2011; SETTIN et al., 2014).

O presente estudo teve como objetivo analisar a associação entre polimorfismos rs1544410 do gene *VDR*, rs1801131 e rs1801133 do gene *MTHFR* na ocorrência de retinopatia diabética em DM2 e sua relação com parâmetros clínicos, bioquímicos, inflamatórios e do estresse oxidativo em estudo de caso-controle em amostra de pacientes diabéticos da Paraíba.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Diabetes mellitus

2.1.1. Epidemiologia e classificação

O Diabetes mellitus (DM) é um distúrbio do metabolismo dos carboidratos caracterizado por um quadro de hiperglicemia crônica. Em 2013 o número de portadores de diabetes em todo o mundo foi estimado em 382 milhões, dos quais 46 % provavelmente desconheciam sua condição, além disso o número de óbitos tendo o DM como causa primária foi de 5,1 milhões no mesmo ano. No Brasil há cerca de 12 milhões de portadores na população entre 20 e 79 anos de idade, o que corresponde a 9 % desta população. A estimativa é que o número de portadores de diabetes alcance os 592 milhões em 2035, o que representa um aumento de 55 % comparado aos números atuais (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2014).

A doença ocupa o quarto lugar em número de mortes dentre as doenças não transmissíveis. Essa elevada prevalência somada à perspectiva de grande crescimento nas próximas décadas em todos os países, bem como o grande número de mortes e elevados gastos financeiros (11 % do total gasto em saúde no mundo em 2013) faz do DM um grave problema de saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Na Paraíba e em João Pessoa a DM afeta respectivamente cerca de 200 mil e 40 mil indivíduos na faixa-etária entre 30 e 69 anos de idade o que corresponde a uma taxa de 10 % nessa população. Em 2009, houve 35 mortes para cada 100 mil habitantes em decorrência de DM na Paraíba, índice superior ao apresentado pelo Brasil e pela região Nordeste (BRASIL, 2011).

A hiperglicemia persistente característica do DM é resultado da incapacidade de secreção e/ou atuação da insulina, um hormônio peptídico que é responsável pela captação da glicose plasmática em quase todos os tecidos do organismo humano, à exceção dos neurônios, logo após à sobrecarga de carboidratos no organismo, assim esse hormônio controla a concentração da glicose no sangue (ASHCROFT; RORSMAN, 2012).

Há dois tipos principais de DM que respondem por um número superior a 95 % de todos os casos identificados e que diferem quanto ao mecanismo que leva a hiperglicemia. O diabetes tipo 1 (DM1), presente em 5-10 % dos casos é causado pela destruição das células β

pancreáticas que por sua vez pode ser desencadeada por infecções virais ou distúrbios autoimunes, havendo também tendência hereditária em muitos casos. O resultado é a deficiência de insulina, um hormônio peptídico que é produzido e secretado pelas células β (FU et al, 2013).

O diabetes do tipo 2 (DM2) presente em 90-95 % dos casos se desenvolve mais lentamente, sendo influenciada por fatores ambientais, hábitos alimentares e estilo de vida, um exemplo é a forte co-associação com a obesidade. Na DM2 todos esses fatores contribuem para a resistência periférica a ação da insulina (HU, 2011). Nos estágios iniciais as células β secretam insulina normalmente, no entanto, a demanda prolongada de produção para compensar a resistência periférica pode conferir certo esgotamento das células β levando à uma deficiência secundária na produção e secreção do hormônio (ASHCROFT; RORSMAN, 2012). Vias diferentes sob o controle combinado de fatores ambientais e genéticos são hipotetizados para resultar na resistência à insulina e insuficiência das células β (SKOVSRØ, 2014).

O diagnóstico da DM é estabelecido a partir da concentração de glicose plasmática > 126 mg/dL no jejum e/ou > 200 mg/dL 2 horas após ingestão de 75 g de glicose (teste de tolerância à glicose oral) e/ou glicemia randômica > 200 mg/dL associada a sinais e sintomas clássicos como poliúria, glicosúria e cetoacidose. Outro marcador importante é a determinação de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) $> 6,5$ % (o valor representa o percentual de moléculas de hemoglobina que sofreu incorporação de glicose sobre o total de moléculas de hemoglobina circulante) que fornece estimativa da glicemia média dos 120 dias anteriores da sua medição, que é o tempo médio de vida de uma hemácia na circulação (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

2.1.2. Complicações vasculares na diabetes

O diabetes prolongado e descontrolado de ambos os tipos resulta em lesões envolvendo vasos sanguíneos de médio e grande calibre como artérias e veias (complicações macrovasculares) e vasos capilares e arteríolas em tecidos específicos (complicações microvasculares) (CHAMNAN et al, 2009; MATHEUS et al., 2013).

As lesões macrovasculares consistem em doença aterosclerótica levando a um risco maior de ocorrências cardíacas ou periféricas, como infarto do miocárdio (HAFFNER et al, 1998), acidente vascular encefálico (ANDRADE et al., 2012; BANERJEE et al., 2012) e gangrena por isquemia, uma causa comum de amputação de membros (ALVARSSON et al,

2012). O DM constitui, portanto, um fator de risco para doenças cardiovasculares (DCV) e esta, por sua vez, é a causa mais comum de hospitalização, morte e invalidez entre os portadores de diabetes em diferentes partes do mundo (YOUNG et al., 2008; JACKSON et al., 2012; FATEMI et al., 2014).

As lesões microvasculares acometem as vênulas, arteríolas e vasos capilares levando a disfunção de órgãos ou tecidos-alvos tendo seus efeitos mais profundos na retina, rim e nervos periféricos, resultando em retinopatia diabética, nefropatia diabética e neuropatia diabética, respectivamente (NATHAN et al, 2009; LITWAK et al, 2013), embora esta última esteja relacionada com alterações em células neuronais em maior escala do que por disfunção microvascular (VINCENT et al., 2011)

O impacto da diabetes sobre as complicações macrovasculares e microvasculares é demonstrada pela consistente associação entre hiperglicemia crônica e a incidência e progressão desses eventos. Foi demonstrado em um grande estudo prospectivo que cada 1 % de redução do percentual de hemoglobina glicada (HbA_{1C}) está relacionada com uma redução de 21 %, 14 % e 37 % no risco de morte por complicações da diabetes, infarto do miocárdio e lesões microvasculares respectivamente no diabetes tipo 2 (STRATTON et al, 2000). Estudo do grupo de pesquisa Diabetes Control and Complications Trial (1993) demonstrou que um controle glicêmico intensivo reduziu em 76 % o risco de início de retinopatia e em 54 % o risco de progressão, bem como reduziu em 39 % o risco de nefropatia e em 60 % para neuropatia em pacientes com DM1 tratados com o objetivo de manter as concentrações de glicose pre-prandial na faixa entre 70 e 120 mg/dl em comparação com pacientes sem controle glicêmico rígido.

Esses achados encontram reforço em estudos mais recentes que mostram a importância do controle glicêmico intensivo e seu impacto na incidência de complicações vasculares em DM1 e DM2 a longo prazo desde que feito a partir dos primeiros anos da doença (GERSTEIN et al., 2008; NATHAN et al., 2009; HOLMAN et al., 2014). Inversamente observou-se que se o controle glicêmico for feito apenas muito tardiamente o papel benéfico pode não ser esperado (KONIG et al., 2013). Esse fenômeno tem sido denominado “memória metabólica” e embora ainda não esteja elucidado há a hipótese de que mecanismos epigenéticos estejam envolvidos (REDDY et al., 2015).

Outros fatores apontados por estudos epidemiológicos estão associados com o desenvolvimento de complicações vasculares no DM de maneira independente ou em combinação com outros fatores, como: dislipidemia (GINSBERG et al., 2010), elevado grau

de obesidade (ALBU et al., 2010) hipertensão sistólica (HATA et al., 2013), tabagismo (CHATURVEDI et al., 1997) e sedentarismo (SLUIK et al., 2012).

As diferentes lesões vasculares desencadeadas na DM compartilham alterações fisiopatológicas semelhantes, embora haja diferenças específicas de cada tecido em resposta ao estresse metabólico comum, por exemplo: aumento da permeabilidade vascular, apoptose de células vasculares importantes, incluindo pericitos da retina e podócitos dos glomérulos renais (características de retinopatia e nefropatia respectivamente), adesão de células inflamatórias, proliferação de células endoteliais ou musculares lisas (na retinopatia e aterosclerose, respectivamente) e por fim alterações hemostáticas, como trombos ou hemorragias (RASK-MADSEN; KING, 2013).

2.1.3. Retinopatia diabética

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação microvascular do DM específica da retina e pode ser definida como uma microangiopatia que afeta as arteríolas, capilares e vênulas retinianas em resposta à hiperglicemia duradoura (ZORENA et al., 2013).

Uma recente análise de estudos de base populacional revelou que em 2012 haviam 93 milhões de portadores de qualquer tipo de RD representando 34,6 % do total global de diabéticos sendo 66 milhões para a retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) e 17 milhões para a retinopatia diabética proliferativa (RDP) na faixa etária de 20-79 anos (YAU et al, 2012).

A RD atinge 90 % dos diabéticos portadores do tipo I e 60 % dos diabéticos tipo II, com faixa etária entre 16 e 64 anos e se manifesta em média após 5 anos de DM2, assim sua presença no momento de diagnóstico da DM2 indica o estágio do avanço da diabetes no período em que foi negligenciada (STRATTON et al., 2001; LOOKER et al., 2012).

Atualmente os critérios aceitos para a classificação clínica da RD são baseados na metodologia do grupo *Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS) padronizada por Wilkinson et al., (2003) e que constitui uma escala de danos visuais encontradas no decorrer da progressão natural da doença (Quadro 1). Clinicamente a RD é identificada pela presença de algumas ou todas das seguintes lesões: microaneurismas, hemorragias, exsudatos duros de lipídios, manchas algodinosas, edema macular, oclusão capilar e neovascularização. A neovascularização marca a progressão para o estágio de pior prognóstico da doença, a RDP, e sua distinção da RDNP no diagnóstico clínico (Fig. 1).

Quadro 1. Classificação da retinopatia diabética

Nível de severidade	Achados na oftalmoscopia após dilatação da pupila
Retinopatia diabética não aparente	Sem anormalidades
Retinopatia diabética não proliferativa Leve	Poucos microaneurismas
Retinopatia diabética não proliferativa Moderada	Quantidade intermediária de aneurismas
Retinopatia diabética não proliferativa Severa	Qualquer um dos seguintes: - mais de 20 hemorragias intra-retinianas em cada um dos quatro quadrantes* - dilatação venosa definitiva - alterações microvasculares intra-retinianas proeminentes no quadrante* - sem sinais de neovascularização
Retinopatia diabética proliferativa	Um ou mais dos seguintes: - neovascularização - hemorragia pré-retiniana/vítrea

*quadrante: ¼ do campo visual da lente do oftalmoscópio (instrumento utilizado para avaliação do fundo de olho). FONTE: Adaptado de Wilkinson et al., (2003).

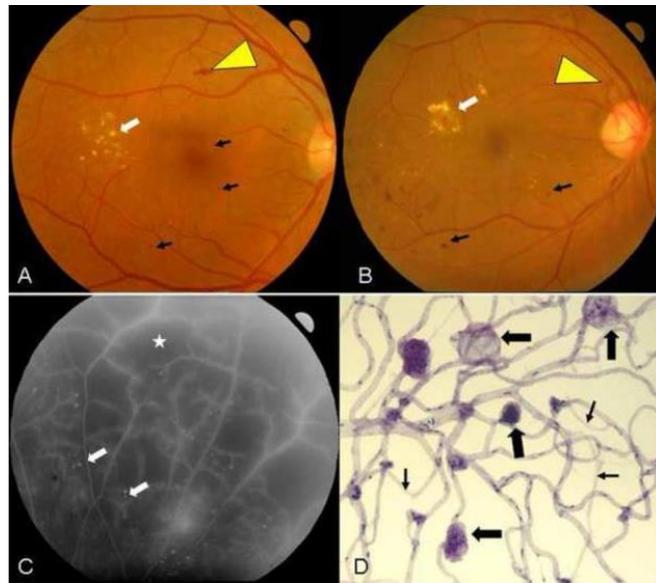


Fig. 1. Oftalmoscopia do fundo de olho na RD. A: RDNP severa com microaneurismas (setas pretas), hemorragia (seta amarela) e exsudatos (seta branca); B: RDP com microaneurismas (setas pretas), juntamente com uma área de neovascularização do disco óptico (seta amarela) e exsudatos (seta branca); C: RDP após uso de marcador fluorescente mostrando áreas de profunda não perfusão da retina (estrela) inúmeros pontos brancos indicando aneurismas (setas brancas); D: microaneurismas capilares (setas grossas) e capilares degenerados (setas finas) em RDP. FONTE: Tang e Kern (2011).

2.1.3.1 Fatores de risco

A prevalência de RD aumenta com a duração do tempo de diabetes, sendo este considerado o mais importante fator de risco para a sua progressão como evidenciado em grandes estudos de base epidemiológica, onde foi observado que em pacientes diabéticos sem qualquer intervenção rígida de controle glicêmico a prevalência de retinopatia era de 8 % após três anos da patologia, enquanto decorridos quinze anos de DM a prevalência da RD era 80 % em DM1 e 86 % em DM2 (KLEIN et al., 1998; KLEIN et al., 2008). Em meta-análise recente Yau et al., (2012) concluiu que após 20 anos do diagnóstico de DM a RD pode ser encontrada em até 76% dos indivíduos. Outros estudos têm confirmado o impacto do tempo de exposição à hiperglicemia em ambos os tipos de DM no surgimento e progressão da RD em diferentes populações (KIM et al., 2011; SALINERO-FORT et al., 2013; XU et al., 2014).

A hiperglicemia persistente desencadeia a maior parte dos processos que promovem o desenvolvimento da RD, assim um controle glicêmico adequado traz benefícios quanto à prevenção em diabéticos recém diagnosticados e/ou progressão para estágios mais avançados em indivíduos já afetados, nesse contexto a principal abordagem na conduta clínica da doença é a redução dos níveis de glicose sanguínea (< 126 mg/dL no jejum) e hemoglobina glicada (< 6,5 %) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015). Concentrações maiores destes dois marcadores caracterizam mau controle glicêmico e sua associação como fator de risco independente para RD tem sido confirmada por vários estudos (STRATTON et al., 2000; KLEIN et al., 2008; KAWASAKI et al., 2011; KIM et al., 2011; SALINERO-FORT et al., 2013; XU et al., 2014).

Hipertensão Arterial (HA) está presente em mais de 60 % dos indivíduos com DM2 em uma relação de co-morbidade assim como a obesidade (NILSSON et al., 2011). A HA é um fator de risco para o desenvolvimento de complicações vasculares no entanto o seu impacto nesses eventos depende da presença de outros fatores de risco (GRASSI et al., 2012), assim tem-se verificado que indivíduos com DM2 e HA (pressão sistólica >140/90 mmHg) apresentam risco maior de desenvolver RD em comparação com indivíduos sem HA (KAWASAKI et al., 2011; SALINERO-FORT et al., 2013). A redução da pressão arterial (PA) para os valores normais (140/90 mmHg) pode ter efeito benéfico no que diz respeito à prevenção da RD para até 4 a 5 anos de DM2 (SIMÓ; HERNÁNDEZ, 2012).

Tem sido reportado associação entre a presença de microalbuminúria e RD em DM2 (MANAVIAT et al., 2004; AJOY-MOHAN et al., 2011; CHEN et al., 2012). Kim et al (2011) reportaram que pacientes com microalbuminúria foram 4,7 vezes mais propensos a ter uma

RD severa do que aqueles sem microalbuminúria entre sul-coreanos com DM2. Por outro lado no estudo espanhol não houve associação significativa entre microalbuminúria e RD, mas apenas uma ligeira tendência [OR = 1,17, 95% CI = 0,75-1,82] segundo os autores (SALINERO-FORT et al., 2013). A microalbuminúria é a excreção urinária de albumina plasmática superior a 30 mg/24h e quando o valor passa de 300 mg/24h o termo empregado é macroalbuminúria, sendo um marcador comumente utilizado de início precoce de lesão renal como no caso da nefropatia diabética (ND) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014). Devido as semelhanças das características fisiopatológicas alguns autores têm interpretado que ND e RD parecem progredir de maneira paralela e que uma condição pode preceder a outra (AJOY-MOHAN et al., 2011; HE et al., 2013).

Recentemente, Salinero-Fort et al (2013) elaborou uma probabilidade de risco para DR com base numa amostra de 2.748 espanhóis com DM2. Esse estudo concluiu que um risco menor para a ocorrência de RD é observado em homens com tempo de DM2 inferior a 7 anos, sem hipertensão ou microalbuminúria, com HbA1c < 7 %, colesterol LDL entre 100-190 mg/dL e que não usaram aspirina regularmente. Já o maior risco foi observado em mulheres com duração de DM2 de mais de 22 anos, com microalbuminúria e hipertensão, HbA1c >8%, colesterol LDL >190 mg/dL e uso regular de aspirina (SALINERO-FORT et al., 2013).

Todos os fatores de risco associados devem ser considerados com o objetivo de prevenir o aparecimento e progressão da RD e conseqüente comprometimento na qualidade de vida dos indivíduos afetados já que a RD traz sérios danos a visão, podendo levar a cegueira caso sua progressão não seja interrompida (EL-ASRAR, 2013).

Estudos que indicam diferença significativa na frequência de RD entre diferentes grupos étnicos (EMANUELE et al., 2005) bem como sua maior agregação entre irmãos não gêmeos independente dos fatores de risco clínicos e ambientais fornecem indícios da existência de componente genético na susceptibilidade à esta complicação (REMA et al., 2002; HIETALA et al., 2008).

Uma variedade de genes candidatos tem sido investigada quanto a sua participação na etiologia ou modulação da RD, dentre os quais: genes que codificam proteínas envolvidas em processos oxidativos (HOVNIK et al., 2009; EL-BAB et al., 2013), proliferativos (HAN et al., 2014), via do poliol (ABHARY et al., 2010) e receptores de produtos de glicação avançada (YANG et al., 2013).

2.1.3.2 Fisiopatologia

Embora definida como uma microangiopatia decorrente da exposição prolongada à hiperglicemia, a fisiopatologia da RD é complexa e parece ser resultado não só de complicações microvasculares, mas também de processos neurodegenerativos e inflamatórios (TANG; KERN, 2011; OLA., et al 2013). No entanto o componente vascular exerce o papel central no desenvolvimento da RD e já é estabelecido que a microvasculatura da retina responde ao estresse metabólico por meio de vias bioquímicas, tais quais, via do poliol, via dos AGEs (produtos finais de glicação avançada), ativação da PKC (proteína cinase C), estresse oxidativo e sistema renina-angiotensina (TARR et al., 2013).

As alterações morfológicas na microvasculatura da retina iniciam-se com espessamento progressivo da membrana basal que reveste os capilares causando a diminuição da perfusão capilar e subsequente isquemia, isso induz a hipóxia que desencadeará uma série de danos ao tecido (CURTIS et al., 2009). A primeira consequência da hipóxia é a perda de pericitos, células associadas a parede endotelial, cuja importância fisiológica consiste em manter, reparar e fornecer suporte ao vaso sanguíneo e regular o fluxo sanguíneo já que possui mecanismo contrátil. A hipóxia juntamente com o espessamento da membrana basal além dos efeitos diretos da hiperglicemia como a produção de AGEs induz o rompimento da estreita ligação entre as células endoteliais os pericitos e a morte destes por apoptose (BELTRAMO; PORTA; 2013).

Outra consequência da hipóxia é a resposta tecidual a essa condição que envolve a produção de citocinas inflamatórias e do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, sigla em inglês para *vascular endothelial growth factor*). O VEGF estimula a proliferação e migração de células endoteliais e também contribui para o aumento da permeabilidade vascular e rompimento da barreira hemato-retiniana. O papel do VEGF no processo da neovascularização que consiste na proliferação de vasos sanguíneos é central, sendo alvo no tratamento da RDP (WIROSTKO; WONG; SIMÓ, 2011.).

A diminuição do tônus vascular causada pela perda de pericitos e o rompimento das junções intercelulares nas células endoteliais também em consequência da hipóxia leva ao aumento da permeabilidade vascular, bem como a ocorrência dos microaneurismas. Tanto na RDNP quanto na RDP o aumento da permeabilidade capilar e/ou o rompimento da barreira hemato-retiniana gera uma condição chamada edema macular (EM) que em estágio avançado constitui a causa da perda visual em indivíduos retinopatas (CURTIS et al., 2009; ZORENA et al., 2013).

2.1.4. Mecanismos bioquímicos para efeito da hiperglicemia

Os efeitos deletérios da hiperglicemia no organismo podem ser explicados por várias vias bioquímicas que possivelmente agem simultaneamente e/ou compartilham alguns processos e produtos. Entender os mecanismos envolvidos é essencial para a compreensão da etiologia dos processos patológicos e sua relação com fatores clínicos e ambientais além de facilitar o desenvolvimento de estratégias para o tratamento (RASK-MADSEN; KING, 2013).

2.1.4.1. Formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs)

Produtos finais de glicação avançada (em inglês, *advanced glycation end products*, AGEs) são resultado de reações não enzimáticas entre grupos carbonila de derivados da glicose, como o 3-deoxiglicosana, que se ligam covalentemente com grupamentos amino de proteínas plasmáticas, a exemplo da albumina, fibrinogênio, imunoglobulinas ou mesmo de proteínas estruturais como o colágeno (SINGH et al., 2014).

No contexto das complicações da DM os AGEs atuam de diversas formas: a primeira delas é a interação direta com moléculas de colágeno da matriz extracelular de grandes vasos, fazendo com que esta perca a sua elasticidade predispondo ao rompimento ou lesão endotelial. Além de seu efeito direto o AGE possui um receptor específico (RAGE) que é expresso em macrófagos, linfócitos T, endotélio e músculo liso vascular (OTT et al., 2014). A interação AGE-RAGE leva a liberação de citocinas e fatores de crescimento inflamatórios, proliferação de células musculares lisas, geração de espécies reativas de oxigênio e atividade pró-coagulatória nas células endoteliais (CHILELLI, 2013).

A avaliação do percentual de hemoglobina glicada (HbA1c), um AGE, tem sido incorporada na prática clínica como um marcador de desordem glicêmica mais sensível que a determinação da glicemia de jejum por ser menos influenciado pelo estado prandial ou estresse agudo e fornecer informações a respeito do controle glicêmico referente a um período de 120 dias que é o tempo médio de uma hemácia na circulação (LYONS; BASU, 2012).

Na retina os receptores RAGE são expressos em pericitos e endotélio e ao interagirem com seus ligantes desencadeiam o processo de apoptose nos primeiros e superprodução de VEGF no segundo, que por sua vez estimula a neovascularização (OTT et al., 2014).

2.1.4.2. Via do poliol

No diabetes a via do poliol é a via de metabolização do excesso de glicose. Células endoteliais fenestradas, como no caso do endotélio da retina, possuem grande permeabilidade à glicose, de forma que os níveis de glicemia intracelular são equiparáveis ao nível plasmático. Nestes tecidos o excesso de glicose intracelular é reduzido a sorbitol por ação da enzima aldose redutase, em seguida parte do sorbitol é convertido em frutose pela ação da sorbitol dehydrogenase. Essa reação usa como cofator a forma reduzida da nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH) que também é requerido na reação de formação de glutathione reduzida (GSH) um importante antioxidante celular. A competição pela NADPH compromete a formação de GSH, assim esse seria um mecanismo pela qual a hiperglicemia persistente aumenta a susceptibilidade celular ao estresse oxidativo (LORENZI, 2007; TARR et al., 2013).

Por causa da sua natureza hidrofílica, o sorbitol excedente da segunda reação não se difunde através da membrana plasmática e se acumula no interior da célula podendo alterar o seu equilíbrio osmótico, já o último produto desta via, a frutose, pode ser fosforilada em frutose-3-fosfato e em seguida clivada em 3-deoxiglicosona, ambos compostos estão envolvidos na formação de produtos finais de glicação avançada (TARR et al., 2013).

A importância desta via no desenvolvimento de complicações microvasculares, sobretudo na retina, é a evidência que um aumento da permeabilidade vascular e da ruptura da barreira sanguínea da retina demonstraram ser evitados na deficiência de aldose redutase (CHEUNG et al., 2005). Os estudos de polimorfismos genéticos também indicam que a aldose redutase está envolvida no desenvolvimento de RD (ABHARY et al., 2010)

2.1.4.3. Ativação da proteína cinase C (PKC)

A hiperglicemia estimula a via de sinalização da proteína cinase C (PKC) através da síntese aumentada de diacilglicerol DAG a partir de intermediários glicolíticos. O DAG é um segundo mensageiro que atua juntamente para a ativação desta via. A ativação da PKC, uma serina/treonina cinase, é uma via de transdução de sinais importante para vários processos fisiológicos, dentre os quais: função neural, inflamação e processos proliferativos (TABIT et al., 2010). Os níveis de DAG acompanham o crescimento da concentração da glicose intracelular em células endoteliais aórticas, pericitos retinianos, células musculares lisas e células mesangiais (GERALDES; KING, 2010).

O impacto da ativação desta via sobre as complicações do diabetes, sobretudo na RD, é mediado pela síntese aumentada de fatores pró-angiogênicos a exemplo do VEGF implicado na neovascularização da retina, produção de citocinas inflamatórias e disfunção de leucócitos que conduzem a episódios de oclusão capilar. Um evento que tem sido bastante implicado com a PKC é a disfunção endotelial (KOLLURU; BIR; KEVIL, 2012). Ensaio clínico utilizando ruboxistaurina como inibidor de PKC demonstrou uma redução significativa no risco de perda visual e progressão da RD (CLARKE; DODSON, 2007).

2.1.5. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre a geração de moléculas altamente instáveis e de elevada reatividade e o sistema de remoção destas. Essas moléculas são chamadas de radicais livres e se caracterizam por serem espécies químicas que possuem um único elétron não pareado na órbita externa do átomo. Exemplos de radicais livres são as espécies reativas derivadas do oxigênio (ERO) e as espécies reativas derivadas do nitrogênio (ERN). É bem conhecido o papel de ERO na lesão celular onde desencadeiam reações autocatalíticas através das quais as moléculas que reagem com eles são convertidas em radicais livres propagando a cadeia de danos (POLJSK; MILISAV, 2012)

Os radicais livres surgem normalmente no organismo como subprodutos de reações de geração de energia na mitocôndria durante a respiração e traz benefícios para algumas condições fisiológicas como a destruição de micróbios nas células fagocitárias. No entanto sua presença sempre é transitória pois o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. Quando esse sistema antioxidante falha ou a produção de ERO aumenta, o resultado é o estresse oxidativo (POLJSK; MILISAV, 2012).

O estresse oxidativo está envolvido na etiologia do câncer, doenças neurodegenerativas, distúrbios psicológicos, aterosclerose, hipertensão, obesidade e diabetes, condições em que as espécies reativas atuam ativando vias sinalizadoras ou modificando irreversivelmente proteínas, lipídios e DNA (RAHAL et al., 2014).

Em relação à DM2 há a hipótese de que o estresse oxidativo esteja relacionado com a sua etiologia por induzir a resistência à insulina (RAINS et al., 2011), bem como está envolvido na patogenia de suas principais complicações (HSU et al., 2015; EL-BAB et al., 2013; SCHAFFER et al., 2012).

2.2. A hiperhomocisteinemia

A homocisteína (Hci) é um aminoácido sulfurado formado pela demetilação da S-adenosil-metionina (SAM) por ação de metiltransferases durante o metabolismo da metionina, um aminoácido essencial. A Hci pode ser metabolizada por duas vias: transsulfuração e remetilação (CHENG et al 2009).

Na transsulfuração a Hci é incorporada a serina para formar cistationina que será posteriormente hidrolisada à cisteína e ocorre quando a síntese desta é requerida para a formação do antioxidante glutatona ou quando há excesso de metionina sendo a cisteína metabolizada em sulfato e excretada pela urina (FINKELSTEIN et al 1988; CHENG et al 2009).

Na remetilação a metionina volta a ser gerada a partir da homocisteína pela ação da metionina-sintase numa reação que requer um doador de radical metil mais o cofator cobalamina (vitamina B₁₂). O radical metil provém do metabolismo do folato que após várias etapas é convertido em o N⁵, N¹⁰-metilenotetrahidrofolato que é então reduzido à N⁵-metilenotetrahidrofolato através da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em reação irreversível (Fig. 2) (SCHALINSKE; SMAZAL, 2012).

Múltiplos fatores são determinantes para a concentração de homocisteína no organismo humano, desde fatores nutricionais como a ingestão de ácido fólico e vitamina B₁₂, fatores ambientais como tabagismo, uso de drogas ilícitas e atividade física (EL-KHAIRY et al 1998; SCHNEEDE et al 2000) e fatores genéticos que envolvam componentes de suas vias metabólicas (BAINES et al., 2007).

A concentração considerada normal de Hci plasmática está situada entre 5 e 10 µmol/L. A hiperhomocisteinemia (HHci) pode ser classificada como moderada (16-30 µmol/L), intermediária (31 - 100 µmol/L) e severa (>100 µmol/L) (MARON e LOSCALZO, 2009; CHENG et al 2009).

A elevação dos níveis plasmáticos, denominada hiperhomocisteinemia, resulta em aumento da produção de produtos de oxidação, como homocisteína tiolactona e uma mistura de dissulfetos de homocisteína (STARKEBAUM; HARLAN, 1986; STAMLER et al., 1993), causa aumento no stress oxidativo (SCHALINSKE; SMAZAL, 2012), evidenciado por elevação em apoptose, níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e expressão de superóxido dismutase (SOD) (RICHARD et a., 2013) induz a expressão de fatores pró-inflamatórios (ZHENG et al., 2003) e aumenta a resistência a insulina (LI et al., 2013), leva à

disfunção endotelial (SCHALINSKE; SMAZAL, 2012), induz dano ao DNA celular através do aumento da peroxidação lipídica e hipometilação do DNA (LIU et al., 2009).

Foi demonstrado que o aumento de 25 % (cerca de 3 $\mu\text{mol/L}$) provoca um risco 10 % maior de complicações cardiovasculares e 20 % maior para acidente vascular encefálico (AVE) após ajuste para outros fatores de risco conhecidos (HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION, 2005).

Uma significativa associação entre hiperhomocisteinemia e complicações macrovasculares foi encontrada em vários estudos e sua relação como fator de risco independente para essas complicações tem sido reconhecido (CLARKE et al., 2012; MA et al., 2014; STANGER et al., 2001).

Vários estudos tem encontrado relação entre hiperhomocisteinemia e retinopatia diabética (BRAZIONIS et al., 2008; ERRERA et al., 2006; KAYADIBI et al., 2014; NIU et al., 2011; MALAGUARNERA et al., 2014; SETTIN et al., 2014; XU et al., 2014).

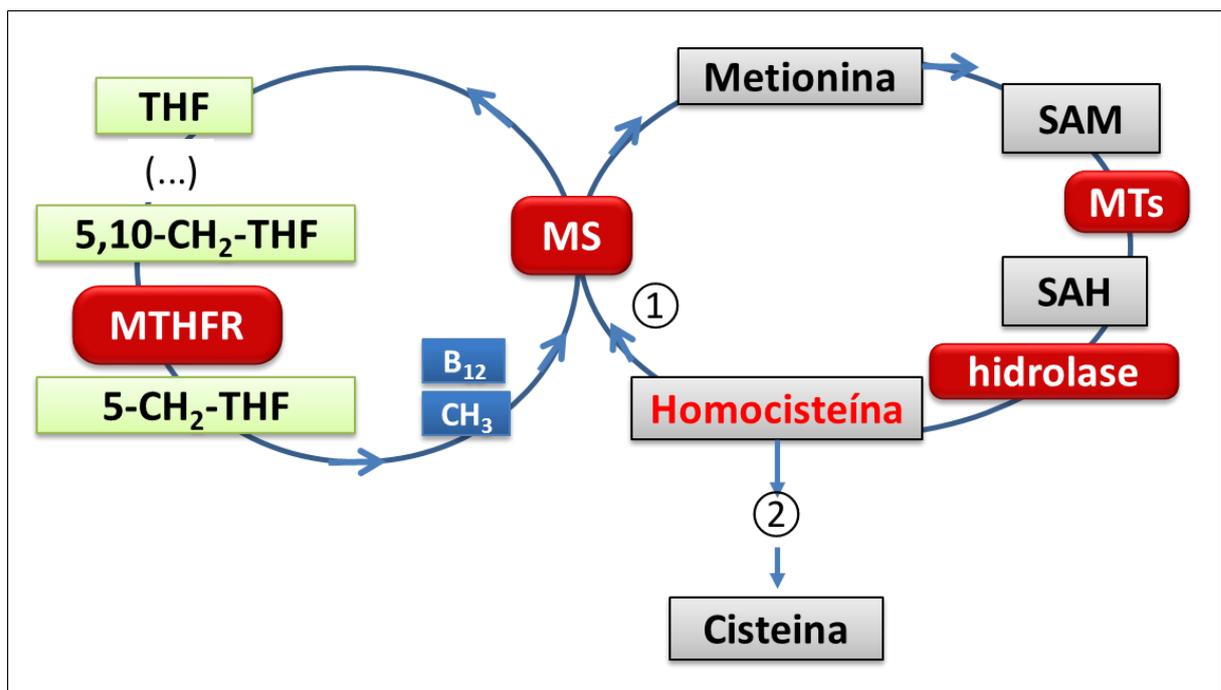


Fig.2. Resumo do metabolismo da homocisteína (①= via da remetilação, ②= via da transsulfuração, B₁₂= cobalamina, CH₃= radical metil, MS= metionina sintase, MTs= metiltransferases, MTHFR= metileno tetrahidrofolato redutase, SAH= S-adenosilhomocisteína, SAM= S-adenosilmetionina, THF= tetrahidrofolato). FONTE: Adaptado de SCHALINSKE e SMAZAL, 2012.

2.2.1. O gene da metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*)

O gene *MTHFR* (HGNC Symbol:7436) está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p.36.22) no genoma humano. O transcrito primário (cDNA) para o *MTHFR* possui 2,2 kb nucleotídeos distribuídos em 11 íntrons e 12 éxons e o seu principal transcrito variante resulta em uma proteína de 656 aminoácidos e peso molecular de 150kDa (GOYETTE et al 1998). Outros transcritos variantes são encontrados em proporções variadas para diferentes tecidos devido ao mecanismo de splicing alternativo do gene. Sua região promotora é desprovida de TATA-box mas contém ilhas CpG e vários sítios de ligação para fatores de transcrição (GAUGHAN et al 2000).

A enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (EC 1.5.1.20) catalisa a conversão de N^5 , N^{10} -metilenotetrahidrofolato um derivado do metabolismo do folato à N^5 -metilenotetrahidrofolato que será o doador final de metil para a reação de remetilação de homocisteína em metionina, participando assim do metabolismo de transferência de grupamentos metil com implicação na síntese e metilação do DNA, bem como no metabolismo da homocisteína (CRIDER et al 2012). A enzima é regulada por inibição alosterica quando há alta concentração de SAM que é sintetizado a partir de ATP (adenosina trifosfato) e metionina. Assim, o excesso de metionina inibe *MTHFR* por *feedback* negativo (SCHALINSKE; SMAZAL, 2012).

2.2.2. O polimorfismo rs1801131

No polimorfismo A1298C (rs1801131) há a transversão entre adenina por citosina (A→C) na posição 1298 no éxon 7 do gene que resulta na substituição de ácido glutâmico por alanina (Glu429Ala) na cadeia polipeptídica (VAN DER PUT, 1998).

Diferentemente do rs1801133 a associação do rs1801131 e níveis mais elevados de homocisteína no plasma é controversa. Weisberg et al., (2001) observou diminuição da homocisteína plasmática em homozigotos mutados “CC” mas em menor amplitude do que observado em genótipo rs1801133/TT. Outros estudos mostraram que heterozigose rs1801131/AC em combinação com heterozigose em rs1801133 mostra associação significativa com aumento de homocisteína e diminuição de folato plasmático (VAN DER PUT, 1998; FRIEDMAN et al 1999; NAGELE et al 2011).

Outro indicador indireto para avaliar o impacto do polimorfismo sobre atividade da MTHFR é a análise do perfil de metilação do DNA global. Nesse caso um estudo feito com portugueses saudáveis mostrou que o genótipo “CC” estava associado com menor metilação de DNA genômico extraído de leucócitos. Novamente se observou diferença na amplitude do efeito entre rs18011133 e rs1801131 que mostrou estar mais fortemente associado (CASTRO et al., 2004). A explicação para a diferença do impacto dos dois polimorfismos na hiperhomocisteinemia é explicado pela posição que ocupam na cadeia polipeptídica da enzima MTHFR. O rs18011133 localiza-se sobre a região que codifica para o domínio catalítico N-terminal, enquanto o rs1801131 está localizado na região que codifica o domínio C-terminal regulatório (WEISBERG et al., 2001).

Até o presente momento o rs1801131 foi implicado com leucemia linfoblástica aguda em chineses (LI et al., 2014); baixo peso de recém-nascidos de mulheres japonesas portadoras do genótipo homozigoto (YILA et al., 2012) e infertilidade masculina (ELOUALID et al., 2012). O polimorfismo parece ter efeito protetor em relação a incidência de fendas orofaciais (HAN et al., 2011).

Recentemente, Rozycka et al., (2013) discutiu o impacto da homocisteína e rs1801131 sobre a doença de Parkinson e sugeriu que uma combinação dos genótipos rs1801131/AA, rs18011133/CT e rs2274976/GG pode implicar em maior incidência de demência. Outra conclusão do estudo é que o rs1801131/AC tem sido observado com mais frequência em vários estágios da doença, bem como nos quadros de perturbações mais pronunciadas de HHci.

2.2.3. O polimorfismo rs1801133

O polimorfismo C677T (rs1801133), localizado no éxon 4 consiste na transição entre citosina e timina (C→T) na posição 677 do gene *MTHFR* resultando na substituição de alanina por valina (Ala222Val) na estrutura da enzima. Essa alteração se localiza no domínio catalítico da enzima, o que a torna termolábil causando redução de 70 % de sua atividade catalítica (FROSST, 1995).

Um genótipo homozigoto para a mutação (TT) predispõe a uma diminuição drástica na atividade específica da enzima (redução para 30 % da atividade) levando a uma significativa elevação da concentração plasmática da Hci (KANG, 1991; FROSST, 1995). Estudo recente relatou alta associação do genótipo TT e níveis superiores de Hci independente à

suplementação de folato, mostrando que o rs1801133 parece ser o mais importante determinante genético para a hiperhomocisteinemia (NAGELE et al 2011).

Tem-se apontado uma associação importante entre este genótipo e o desenvolvimento de nefropatia em pacientes diabéticos (ZINTZARAS et al., 2007; CUI et al., 2012, YANG et al., 2013; NIU e QI, 2012).

Wang et al., (2012) demonstrou que além do genótipo TT ter sido associado significativamente com neuropatia diabética em chineses [OR 1,7 (IC 95 %: 0,731-4,105) $p=0,021$] também foi associado com concentrações mais altas de homocisteína plasmática ($p=0,023$) reforçando a regra da hiperhomocisteinemia. Outros estudos têm encontrado esta mesma relação (YIGIT et al., 2013)

Estudos tem avaliado a relação do rs1801133 e retinopatia diabética (RD). Maeda et al relataram associação significativa entre progressão de RD e 677T junto ao controle inadequado dos níveis glicêmicos em japoneses com DM2 (MAEDA et al., 2003a; MAEDA et al., 2003b; MAEDA et al., 2008).

Em indivíduos turcos, Yigit, Karakus e Inanir (2009) encontraram frequência significativamente maior do genótipo TT em pacientes com RD que no grupo de pacientes sem RD (59,1 % e 40,9 % respectivamente, $p=0,039$). Entretanto o mesmo estudo não encontrou o mesmo índice de significância para o genótipo heterozigoto CT. Em outro estudo realizado com 52 indivíduos diabéticos também da Turquia, Ukinc, et al, (2009) também não encontrou associação entre o genótipo heterozigoto do polimorfismo e RD.

Zintzaras et al. (2005) realizaram uma meta-análise de cinco estudos que analisaram a relação entre C677T e RD e que incluíram no total 435 casos (DM2 com RD) e 620 controles (DM2 sem RD) e os seus resultados indicaram apenas uma associação marginal entre os genótipos polimórficos e RD. Nesta meta-análise os estudos de maior número amostral não encontraram associação significativa (YOSHIOKA et al 2003; SANTOS et al 2003) em contraste com o de menor grupo amostral (NEUGEBAUER et al 1997). No total, a prevalência do alelo T foi de 43 % e 37 % para RD e grupo controle, respectivamente. A distribuição dos genótipos foi de 19 % e 14 % para TT, 33 % e 40 % para CC e 48 % e 46 % para heterozigotos entre os grupos com RD e o controle, respectivamente. Foi apontada ainda que a diferença de resultados entre grandes e pequenos estudos constituiu um viés sendo necessário estudos prospectivos maiores e mais criteriosos (ZINTZARAS et al. 2005).

Como resultado de uma meta-análise recente, que incluiu oito estudos de associação caso-controle com um total de 1599 pacientes, o genótipo 677TT foi associado com um risco moderadamente aumentado de retinopatia diabética, no entanto, associação foi observada

mais fortemente nos estudos que analisaram indivíduos do leste asiático, por outro lado não se pode excluir a implicação do polimorfismo em outras populações (NIU; KI, 2012).

2.3. Vitamina D

2.3.1. Metabolismo da vitamina D

A vitamina D é um hormônio esteroide envolvido em importantes processos fisiológicos cujas necessidades corporais deste hormônio são atendidas em maior parte (80-90 %) por sua síntese cutânea (colecalfiferol ou vitamina D₃) a partir do precursor 7-deidrocolesterol após estimulação da luz solar; e em menor parte (10-20 %) originados da dieta (ergocalciferol ou vitamina D₂) (WAGNER et al., 2008).

A síntese de vitamina D₃ (Fig. 3) ocorre na membrana plasmática de células da epiderme através de uma reação de fotólise onde os raios UVB (comprimento de onda: 290-312 nm) causam um rearranjo das ligações duplas do anel fotolítico do precursor 7-deidrocolesterol (pró-vitamina D₃) convertendo-o em vitamina D₃ ainda na sua forma inativa. Após a conversão, a vitamina D₃ se difunde através do espaço extracelular até chegar ao plasma onde se liga a uma proteína transportadora, a proteína de ligação a vitamina D (DBP) e então é distribuída através da circulação sanguínea. O ergosterol originado da dieta também pode ser metabolizado de modo similar à vitamina D₃, gerando o análogo ergocalciferol ou vitamina D₂. Após etapa inicial, ambos análogos permanecem em sua forma inativa e passarão por etapas de conversões enzimáticas até atingirem sua forma biologicamente ativa. A primeira etapa de ativação da vitamina D (agora compreendendo as duas formas) é a hidroxilação do carbono 25 por ação de uma 25-hidroxilase. Essa reação ocorre predominantemente no fígado, no entanto outros tecidos também expressam a enzima. A 1,25(OH)₂D₃ é a forma biologicamente ativa da vitamina D e é gerada após conversão da 25(OH)₂D₃ (colecalfiferol) pela enzima α 1-hidroxilase que é mais presente no rim (JONES et al., 2014).

A 1,25(OH)₂D₃ tem suas ações mediadas por um receptor nuclear pertencente à família de receptores hormonais nucleares, o receptor de vitamina D (VDR). O VDR humano tem peso molecular de 50 kDa e 427 resíduos de aminoácidos e possui um domínio de ligação para a 1,25(OH)₂D₃ e um domínio com dois dedos de zinco para ligação ao DNA e ativação de transcrição em *trans* (BAKER et al 1988).

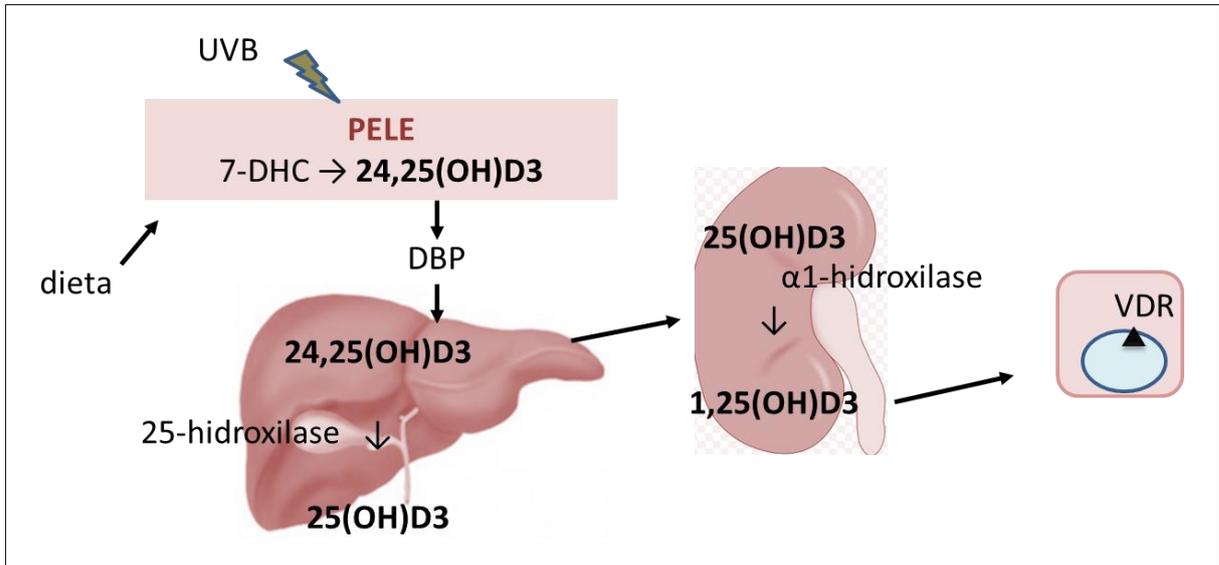


Fig. 3. Síntese e metabolismo da vitamina D (7-DHC= 7-deidrocolesterol, DBP= proteína de ligação à vitamina D, VDR= receptor de vitamina D). FONTE: Adaptado de CHAGAS et al., 2012.

A resposta celular desencadeada pelo VDR depende não só dos níveis circulantes de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, mas também da abundância da expressão do VDR que é regulada por modificações transcricionais e pós-transcricionais. Essa regulação permite diferentes e graduais respostas celulares.

O VDR é o efetor central das ações da vitamina D no organismo com impacto em vários processos fisiológicos a exemplo do metabolismo do cálcio e fosfato, metabolismo insulínico, modulação de processos proliferativos, de diferenciação celular e do sistema imune, portanto, alterações no VDR podem ter potencial de acarretar desequilíbrios fisiológicos que por sua vez possam contribuir para instalação de processos patológicos diversos (ANDRUKHOVA et al., 2014; CHEN et al., 2014).

2.3.2. O gene do receptor de vitamina D (VDR)

O gene *VDR* (HGNC Symbol:12679) está localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q.13.11) do genoma humano. Análise em seu cDNA demonstrou que os exons são separados por introns extensivamente grandes o que confere ao gene uma quantidade de 75 kb de nucleotídeos enquanto a principal isoforma do seu RNA mensageiro possui 4,6 kb (BAKER et al 1988).

O gene possui 11 exons dos quais 8 deles (exons 2 ao 9) codificam o produto final enquanto o exon 1, subdividido em 1A, 1B e 1C, tem funções regulatórias. O domínio de ativação de transcrição e ligação de DNA é codificado pela região compreendida pelos exons 2 e 3. Os exons 7, 8 e 9 codificam para o domínio de ligação para 1,25-(OH)₂D₃. A região promotora localizada no éxon 1A não apresenta uma região TATA-box aparente mas é rica em guanina e citosina, além de apresentar vários sítios de iniciação da transcrição. A união diferencial dos exons não codificantes 1B e 1C resulta em três isoformas de RNAm (splicing alternativo) cujas funções permanecem indefinidas. Além disso há múltiplos locais de iniciação da transcrição e tradução. O VDR pode ser regulado tanto a nível transcricional quanto a nível pós-transcricional (MIYAMOTO et al, 1997). A expressão de transcritos primários variantes também parece ser tecido-específica (CROFTS et al, 1998).

A proteína cinase A (PKA) regula positivamente a transcrição do VDR em fibroblastos de camundongos resultando em aumento considerável da atividade biológica da 1,25-(OH)₂D₃ (KRISHNAN; FELDMAN, 1991a), por outro lado ativação da PKC e níveis aumentados de Ca²⁺ intracelular diminuem a expressão do RNAm e conseqüentemente da proteína (KRISHNAN; FELDMAN, 1991b).

Polimorfismos genéticos humanos do VDR têm sido identificados e investigados quanto à sua relação com fenótipos de interesse médico. O primeiro a ser estudado foi o rs2228570, localizado no primeiro códon de iniciação da tradução (ATG → ACG) do exon 2, o qual transfere o início da transcrição para o segundo códon de iniciação resultando em um produto gênico de 424 aminoácidos, três aminoácidos mais curto que a variante selvagem (SAIJO et al 1991). Nesse polimorfismo, também chamado de *FokI* (nome da enzima de restrição que o reconhece) curiosamente, a variante menor “F” confere maior atividade para o receptor, sendo considerada fator protetor na osteoporose (GROSS et al, 1997; ARAI et al, 1997), câncer de pulmão (HEIST et al, 2008), de pele e de mama (RAIMONDI et al, 2009).

Por outro lado a variante maior gerada pelo alelo “f” tem sido associado com risco para DM1 em asiáticos (WANG et al, 2014) bem como para o risco de desenvolvimento do DM2 (LI et al 2013; AL-DAGHIRI et al, 2014; ABDEL TIF et al, 2014) embora outros estudos não confirmem essa associação (GUO et al 2006; ZHANG et al 2012; BID et al, 2009).

Outros polimorfismos que tem emergido na literatura em busca de associações fenotípicas importantes são: rs731236 (*TaqI*), rs1544410 (*BsmI*) e rs7975232 (*ApaI*) (CYGANNEK et al, 2006; NOSRATABADI et al., 2010; PUNZI et al., 2012; RASSOL et al, 2014)

Uma forte co-associação foi observada entre *BsmI* e outras duas sequências variantes: *ApaI* e *TaqI*, sendo possível descrever haplótipos para esses polimorfismos dos quais emergiram dois bastante comuns: *BAt* e *baT*. Morrison et al., (1994) encontrou coexistência entre alelo *b* e o alelo *T* em 97 % dos indivíduos estudados. Estudo realizado na Holanda relatou a frequência de *baT* e *BAt* em 47,7 % e 40,4 %, respectivamente, na população (UITTERLINDEN et al, 1996).

Foi proposto que a estabilidade do RNAm do VDR seria influenciada pelos alelos haplotipos variantes de *BsmI*, *ApaI* e *TaqI*, mas análise no RNAm dos haplótipos *BAt* e *baT* em células de linhagens hematopoiéticas e de câncer de próstata não demonstrou diferença na estabilidade entre esses haplótipos ou os diferentes genótipos. No entanto observou-se uma produção 30 % menor de RNAm do haplótipos *BAt*, em comparação com *baT*, indicando uma variação na regulação transcricional e não na estabilidade do RNAm (VERBEEK et al, 1997; WHITFIELD et al, 2001). Outro estudo que investigou o impacto do *BsmI* na concentração de RNAm em análise feita em monócitos extraídos de indivíduos da América do Norte não apresentou diferença entre os genótipos *BB*, *Bb* e *bb* (MOCHARLA et al., 1997).

Também foi observada forte associação entre *BsmI* e repetições em tandem de número variável (VNTR) na calda poli-A da extremidade 3' do gene (INGLES et al., 1997). Este último polimorfismo tem pelo menos 12 alelos diferentes mas a variação de tamanho do alelo poli-A VNTR segue essencialmente um padrão bimodal. Este padrão é de tal modo que este marcador pode ser caracterizado como bi-alélico e que os indivíduos podem ser classificados como tendo alelos com curta ou longa poli-A sendo o alelo *b* mais associado com a sequência longa e o alelo *B* com a sequência curta da calda poli-A (INGLES et al., 1997). Com base nessas informações Uitterlinden et al (2004) concluíram que o haplótipo *baT* está associado a maior quantidade de adeninas (n = 18-24) enquanto o haplótipos *BAt* é associado a menor quantidade de adeninas (n= 13-17) na poli-A VNTR.

2.3.3. O polimorfismo rs1544410

O rs1544410 situa-se no íntron 8 do gene e resulta na mudança de uma guanina por adenina (G→A). Por estar localizado em região não-codificante do gene, este polimorfismo não causa alteração na sequência de aminoácidos da cadeia polipeptídica. Foi descrito primeiramente por Morrison et al (1992) como uma variação da presença do sítio de restrição para a enzima *BsmI*, e que apresentou diferença significativa entre seus genótipos em homozigose (*BB* e *bb*) e os níveis de osteocalcina circulante, tendo seus valores maiores para

o genótipo *BB* ($p=0,0001$). Assim foi sugerido que o alelo *B* conferia ao VDR uma maior atividade como ativador da transcrição do gene da osteocalcina (MORRISON et al, 1992).

O *BsmI* em homozigose (*bb*) foi associado com o risco diminuído de osteoporose (MORRISON et al, 1992; UITTERLINDEN et al, 1996; JIA et al 2012). O alelo *b* tanto em homozigose quanto em heterozigose tem teve efeito protetor para tuberculose em europeus caucasianos (CHEN et al, 2013)

O alelo *B* foi associado com risco para lúpus eritomatoso sistêmico em chineses (LUO et al, 2012) e japoneses (OZAKI et al, 2000). No entanto não foi encontrada associação entre qualquer alelo do rs1544410 em brasileiros (MONTICIELO et al, 2012), poloneses (KALETA et al, 2013; MOSTOWSKA et al, 2013) e tailandeses o que demonstra grande variabilidade na predominância alélica entre diferentes etnias (SAKULPIPATSIN et al, 2006).

Foi encontrada associação significativa entre o alelo *b* ($p= 0,028$) com risco para obesidade em estudo caso-controle feito na Arábia Saudita. O mesmo estudo associou *bAT* como haplotipo de risco para uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias (AL-DAGHRI et al 2014b).

Tem sido estabelecido o papel do alelo *b* como alelo de risco em caucasianos para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (FALLETI et al, 2010), câncer de mama (BRETHERTON-WATT et al, 2001; FUHRMAN et al, 2013), câncer de pele (LI et al, 2010), câncer de próstata (RAIMONDI et al, 2009) e câncer renal (ARJUMAND et al., 2012).

Os níveis séricos de proteína C reativa (PCR), um modulador inflamatório, se mostraram mais elevados em pacientes oncológicos acometidos por caquexia que possuíam ao menos um alelo *b* ($p=0,011$) ou um alelo *T* da *TaqI* ($p= 0,001$) conferindo aos portadores destes alelos um pior prognóstico da doença (PUNZI et al, 2012). Também foi encontrada associação entre nível elevado de PCR e o alelo *b* para risco cardiovascular em pacientes com doença renal avançada (PACINI et al, 2008 *apud* PUNZI et al, 2012).

O genótipo *bb* foi associado ao risco de DM1 na população global (ZHANG et al, 2012; QIN et al, 2014; WANG et al, 2014), mas quando os dados são estratificados por etnias, variações são observadas, a exemplo da associação entre o alelo *B* e o genótipo *BB* em africanos (QIN et al, 2014).

No caso da DM2 nenhum dos genótipos mostraram diferença significativa em indianos (BID et al 2009), chineses (LI et al 2013) e marroquinos (ABDELTIF et al, 2014) embora tenha sido observado que o genótipo *bb* confere maior resistência à insulina em caucasianos (OH; BARRETT-CONNOR, 2002). Al-Daghri et al (2014a) encontrou associação

significativa entre o genótipo *Bb* e o alelo *b* com níveis baixos de HDL além de associá-los ao aumento do risco para DM2 e obesidade em árabes.

Foi encontrada leve associação entre o alelo *b* e ocorrência de RD em população da Croácia com DM1 ($p=0,05$) após correção pelo tempo de duração da doença (BUCAN et al., 2009). Estudo caso-controle feito com indivíduos poloneses com DM2 investigou a associação entre os polimorfismos *FokI*, *TaqI*, *ApaI* e *BsmI* com a presença de RD. O estudo reportou alta prevalência do genótipo *bb* ($> 40\%$) e do alelo *b* ($> 85\%$) em toda a população estudada, mas não houve associação entre *BsmI* e RD ($p=0,79$) nem entre os outros polimorfismos estudados (CYGANNEK et al, 2006). Associação entre o *BsmI* e RD também foi testado em estudo feito com italianos, mas não foi encontrada diferença significativa entre afetados e grupo controle (CAPOLUONGO et al., 2006).

2.4. Justificativa

A atividade defeituosa dos genes VDR e MTHFR pode atenuar mecanismos implicados na patogenia da RD, por estarem inseridos em vias metabólicas que influenciam o equilíbrio oxidativo, no entanto, o impacto dos polimorfismos rs1801131 e rs1801133 da MTHFR permanece inconclusivo, pois foram descritos resultados controversos em diferentes populações (ERRERA et al., 2006; NIU et al., 2011; SETTIN et al., 2014), enquanto que para avaliação do papel do polimorfismo rs1544410 do VDR há poucos estudos realizados e nenhum deles na população brasileira.

3. OBJETIVOS

3.2. Objetivo geral

Analisar a associação entre parâmetros clínicos e polimorfismos dos genes *VDR* e *MTHFR* na ocorrência de retinopatia diabética em DM2 utilizando abordagem de caso-controle.

3.3. Objetivos específicos

- Comparar diabéticos com RD e sem RD quanto a parâmetros antropométricos, bioquímicos, inflamatórios e relacionados ao estresse oxidativo,
- Comparar as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos rs1544410, rs1801131 e rs1801133.
- Analisar o efeito dos genótipos do(s) polimorfismo(s) que apresente(em) associação significativa com RD nos parâmetros bioquímicos, inflamatórios e relacionados ao estresse oxidativo,

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho do estudo

Tratou-se de estudo epidemiológico do tipo transversal que se caracteriza pela observação direta de determinado fator e efeito em indivíduos em uma única oportunidade (KLEIN; BLOCH, 2009).

A amostra foi constituída de 109 pacientes portadores de DM2 atendidos nos serviços de Endocrinologia e Oftalmologia da Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (HULW/UFPB) entre agosto de 2013 e dezembro de 2014.

Os critérios para inclusão dos participantes foram:

- Ter entre 5 e 10 anos de DM2
- Ter a partir de 40 anos de idade.

Para garantir que o tamanho da amostra foi representativo para a população estudada o cálculo amostral levou em consideração a população de João Pessoa estimada em 783 mil habitantes, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2013, cerca de um terço possui idade superior à 40 anos resultando em universo de 313.200. Considerando-se uma prevalência estimada de 8% dos diabéticos, é de esperar que a cidade tem algo em torno de 25.056 diabéticos com idade superior a 40 anos. Assumindo uma proporção de 20% dos diabéticos que têm retinopatia (10.022 indivíduos) e nível de confiança de 95%, com mais de 8% de erro, o cálculo da amostra resultou em 97 indivíduos.

Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Pesquisas em Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley (protocolo: 796.459/14, ANEXO A) e os procedimentos seguidos estavam de acordo com os padrões éticos da instituição, da Resolução n° 466/12 CNS/MS e da Declaração Internacional de Helsinque. Todos os participantes foram esclarecidos quanto aos objetivos do estudo e forneceram consentimento informado por escrito (ANEXO B). Todas as amostras foram codificadas a fim de resguardar o direito à privacidade dos participantes.

Caracterização clínica

Todos os participantes da pesquisa são portadores de DM2 usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) encaminhados via regulação interinstitucional para triagem ou

acompanhamento de RD no Centro de Oftalmologia do HULW (CEROF). Os pacientes abordados no serviço de Endocrinologia do mesmo hospital tiveram consulta oftalmológica pré-agendada pelo pesquisador em concordância com a coordenação do CEROF.

O diagnóstico de RD foi baseado através da análise de fundo de olho por oftalmoscopia após dilatação da pupila com tropicamida 0,5% em 109 pacientes. Indivíduos com DM2 que apresentaram qualquer grau de retinopatia constituíram o grupo RD (n=40), enquanto o segundo grupo foi constituído de indivíduos com DM2 sem RD (n=69).

Informações clínicas e antropométricas como sexo, idade, tempo de DM2, IMC (índice de massa corporal) e pressão arterial foram obtidas no momento da avaliação clínica no serviço de Endocrinologia.

Para 62 pacientes foi agendada nova data para realização de coleta de sangue em jejum de 12 horas. Amostra de urina de 24 horas coletada em frasco apropriado também foi solicitada. Análise genética foi feita em todos os 109 pacientes do estudo.

Determinações bioquímicas

O sangue foi coletado por meio de punção venosa em 3 tubos estéreis diferentes: tubo 1 (com anticoagulante EDTA K₃) para de 4 ml de amostra, tubo 2 (com anticoagulante fluoreto de sódio) para 4 ml de amostra e tubo 3 (com ativador de coágulo) para 6 ml de amostra. Todas as análises bioquímicas foram processadas no Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e Saúde (LETFADS) do Departamento de Educação Física da UFPB. Todas as amostras dos tubos 2 e 3 foram imediatamente centrifugadas para obtenção de plasma e soro respectivamente e submetidas à análise em período inferior à 2 horas após a coleta. Alíquotas de soro e plasma foram ainda armazenadas sob -80°C para análises posteriores.

Uma quantidade de 10 µl do sangue total obtido com o tubo 1 foi usada para determinação da HbA_{1c}. Para tanto foi utilizada a técnica de imunoturbidimetria em analisador automatizado (LabMax 240, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) em período inferior à 2 horas após a coleta, utilizando kit padronizado e seguindo as orientações recomendadas pelo fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Uma alíquota do plasma obtida do tubo 2 (250 µl) foi usada para determinação de glicose plasmática (método glicose oxidase) em analisador automatizado utilizando kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Na alíquota de soro obtida do tubo 3 (250 µl) foram feitas dosagens de creatinina sérica (método picrato alcalino), proteína C reativa (PCR) (método imunoturbidimetria) HDL

(método ultracentrifugação-detergente seletivo) colesterol total e triglicerídeos (método enzimático-Trinder) em analisador automatizado utilizando kit comercial de acordo com as orientações recomendadas pelo fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Concentração de colesterol LDL foi determinada pela fórmula de Friedewald onde: $[LDL]=[colesterol\ total]-[HDL]-[triglicerídios/5]$.

Para dosagem de malondialdeído (MDA), foi utilizado o método baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos (OHKAWA et al., 1979). Para isto, 250 µl de plasma foi adicionado a KCl e incubado em banho-maria a 37°C por 60 minutos. Em seguida, a mistura foi precipitada com ácido perclórico a 35 % e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos eppendorfs, adicionado 400 µl de ácido tiobarbitúrico a 0,6 % e incubado a 95 – 100° C por 30 minutos. Após o resfriamento, o material foi lido em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 532 nm.

A capacidade antioxidante total (CAT) do soro sanguíneo foi avaliada através da redução do radical 2,2 difenil-1- picril-hidrazila medido por método colorimétrico em espectrofotômetro. Para sua determinação utilizou-se 50 µl de soro (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

A urina foi usada para detecção de albumina urinária (método turbidimétrico) em analisador automatizado utilizando kit comercial de acordo com as orientações recomendadas pelo fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). Foi recomendada coleta da urina em recipiente estéril no período de 24 horas a contar da segunda urina da manhã. Valor da excreção de albumina em 24h foi determinada pela sua concentração em mg/dl, multiplicado pelo volume urinário de 24 horas em litros. Microalbuminúria é definida como concentração de albumina urinária > 30 mg/L/24h.

Coleta e isolamento do DNA genômico

Células do epitélio bucal foram obtidas através de bochecho com solução de sacarose 3% e conservadas com solução 66% alcoólica contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM NaCl e 7mM EDTA. O material foi coletado em tubos de 15 ml do tipo *falcon* estéreis e livres de DNases e RNAases e em seguida levadas ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada do Departamento de Biologia Molecular da UFPB.

Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o precipitado celular foi lavado em solução aquosa, contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl e 7 mM EDTA para em seguida ser feita nova centrifugação. Novamente o sobrenadante foi descartado e o

precipitado foi então ressuscitado em solução de lise contendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA, 0,2 µg de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubado a 55°C em banho-maria. Após 12 horas de incubação foi adicionado 500 µl de uma solução aquosa de 1 mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 min a 12.000 g a 4°C e 900 µl do sobrenadante foi transferido para novo tubo onde foi realizada precipitação do DNA com 540 µl de isopropanol. A seguir o precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol, centrifugado (12.000 g por 5min), seco e ressuscitado em tampão Tris-EDTA (AIDAR; LINE, 2007).

Análise do polimorfismo rs1801131

Foram utilizados os iniciadores: 5'-CTTCTACCTGAAGAGCAAGTC-3' (sense) e 5'-CATGTCCACAGCATGGAG-3' (antisense) (HANSON et al., 2001) e a amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação (1 minuto à 94°C), anelamento (2 minutos à 55°C) e extensão (2 minutos à 72°C) com uma etapa extra de extensão final de 10 minutos. O produto de 256 pb foi digerido com *MboII*. O tratamento com essa enzima gera 4 fragmentos para o alelo polimórfico C (204 pb, 30 pb, 28 pb e 22 pb) ou 3 fragmentos para o alelo ancestral A (176 pb, 30 pb e 22 pb). Os genótipos foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e coloração com nitrato de prata 0,5% (Fig 4.A).

Análise do polimorfismo rs1801133

Foram utilizados os iniciadores: 5'-TGAAGGAGAA GGTGTCTGCGGGA-3' (sense) e 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3' (antisense) (FROSST et al., 1995). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 10 minutos, 35 ciclos de desnaturação (30 segundos à 94°C), anelamento (30 segundos à 61°C) e extensão (30 segundos à 72°C) com uma etapa extra de extensão final de 10 minutos. O produto de 198 pb foi digerido com *HinfI* que reconhece e cliva o alelo polimórfico T gerando dois fragmentos (175 pb e outro de 23 pb) enquanto o alelo ancestral C permanece com 198 pb. Os genótipos foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e coloração com nitrato de prata 0,5% (Fig 4.B).

Análise do polimorfismo rs1544410

Os genótipos foram determinados por PCR-RFLP. Foram utilizados os iniciadores: 5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3' (sense) e 5'-AACCAGCGGGAA

GTCAAGGG-3' (antisense) (PANI et al., 2000) e a amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 10 minutos, 30 ciclos de desnaturação (1 minuto à 94°C), anelamento (1 minuto à 58°C) e extensão (3 minutos à 72°C) com uma etapa extra de extensão final de 10 minutos. O produto de 825 pb foi digerido com *BsmI* que reconhece e cliva o alelo polimórfico b gerando dois fragmentos (650 pb e outro de 175 pb) enquanto o alelo ancestral B permanece com 825 pb. Os genótipos foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e coloração com nitrato de prata 0,5% (Fig 4.C).

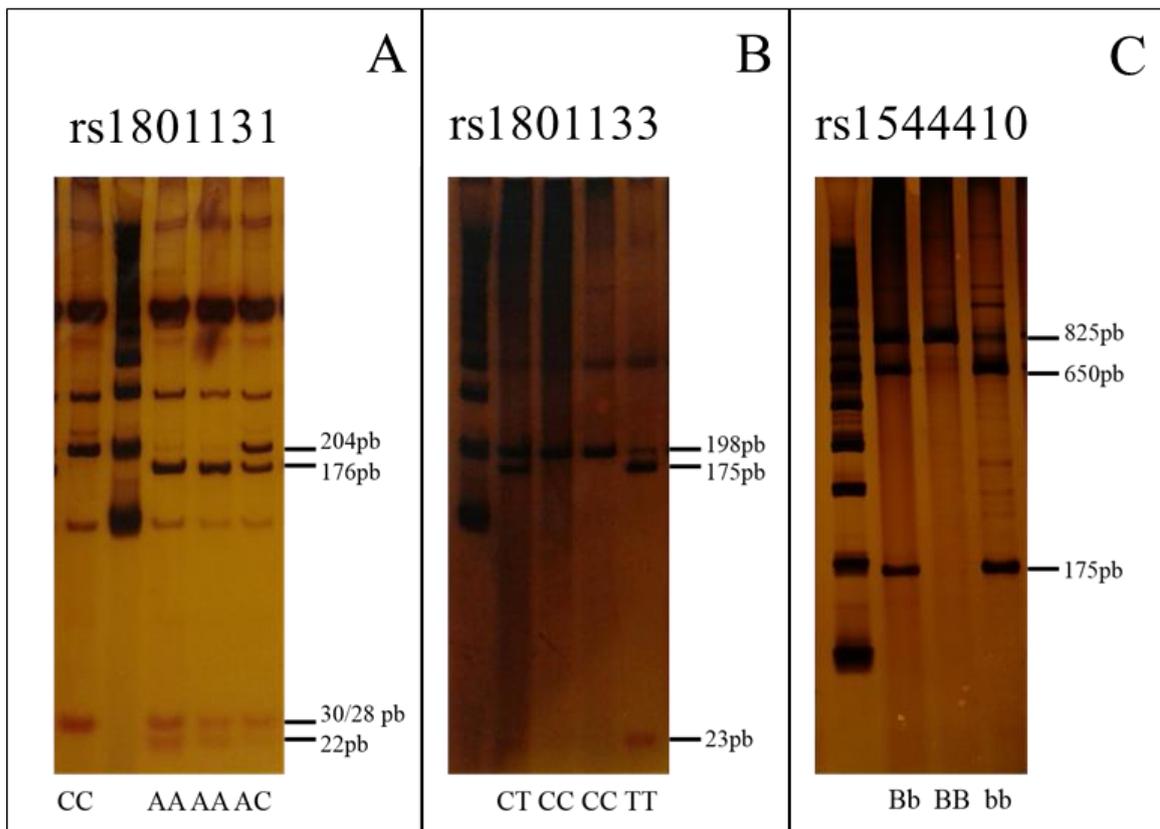


Fig. 4. Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata 0,5% mostrando amostras genotipadas para rs1544410 (A), rs1801131 (B) e rs1801133 (C)

Análise estatística

Os dados quantitativos foram expressos por média e desvio-padrão, enquanto os dados qualitativos foram expressos por números absolutos ou valores percentuais. Comparações entre grupos foram feitas com o teste T independente ou com o seu correspondente não-paramétrico Mann-Whitney. As distribuições de alelos e genótipos entre os grupos foram comparadas usando o teste exato de Fisher. Adotou-se um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Os dados foram analisados por meio do software Graph Pad Instat 3.0 (San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

As características antropométricas, epidemiológicas e metabólicas dos grupos de indivíduos afetados com RD e controles estão retratadas na Tabela 1. Não houve diferença significativa entre grupo controle e afetado nas variáveis antropométricas, epidemiológicas e metabólicas exceto para Microalbuminúria de 24h ($p=0.004$) e creatinina sérica ($p=0.03$) ambos significativamente maior no grupo RD.

A distribuição genotípica e frequência alélica estão identificadas na Tabela 2. Não houve diferença estatística na frequência alélica e genotípica para o rs1801131 entre os grupos com RD e sem RD. A frequência do alelo rs1801133/*T* foi de 37,5 % nos indivíduos com RD e 26,8 % nos indivíduos sem RD; o genótipo rs1801133/*TT* foi mais frequente nos indivíduos com RD (17,5 %) em relação aos sem RD (5,8 %), ambos os resultados para o rs1801133 não apresentaram significância estatística ($p=0,127$ e $p=0,094$ respectivamente). O alelo *b* do rs1544410 [OR 1,8 (1,02-3,18), $p = 0,047$] e o modelo dominante *Bb* + *bb* [OR 0,3 (0,09-0,93), $p = 0,049$] mas não o genótipo *bb* [OR 0,6 (0,26-1,38), $p = 0,29$] foram associados com aumento de risco para RD.

A presença de associação significativa entre o rs1544410 e RD motivou a análise da influência dos seus genótipos frente aos demais parâmetros e marcadores avaliados neste estudo na qual foram apresentados resultados similares (Tabela 3), no entanto, pode-se perceber uma tendência a maiores valores de proteína C reativa (PCR) para o genótipo *bb* em relação ao grupo de portadores dos genótipos *BB* ou *Bb* ($p=0,09$) sem significância estatística.

Tabela 1. Caracterização antropométrica, clínica, bioquímica e metabólica da população estudada

	<i>Com RD (40)</i>	<i>Sem RD (69)</i>	<i>p</i>
<i>Sexo (M%)</i>	48,78%	28,57%	0,053
<i>Idade (em anos)</i>	56,87 ± 8,95	58,5 ± 9,12	0,365
<i>Duração DM2 (em anos)</i>	7,7 ± 2,22	6,52 ± 2,19	0,062
<i>Hipertensos (%)</i>	68,3%	68,6%	0,97
<i>Dislipidêmicos (%)</i>	76,92%	62,85%	0,29
<i>IMC (peso/altura²)</i>	27,56 ± 4,08	29,02 ± 4,85	0,108
<i>Circ. abdominal</i>	104,75 ± 12,6 (12)	101,96 ± 12 (53)	0,474
<i>HbA1c (%)*</i>	8,25 ± 1,8	8,34 ± 1,5	0,709
<i>Glicemia de jejum (mg/dL)*</i>	151,8 ± 65,9	163,8 ± 56,25	0,549
<i>Colesterol total (mg/dL)*</i>	204,4 ± 62	208,2 ± 52,5	0,839
<i>HDL(mg/dL)*</i>	43,5 ± 8,2	42,5 ± 10	0,758
<i>LDL(mg/dL)*</i>	127,6 ± 54,6	131,5 ± 45,7	0,799
<i>Triglicerídeos(mg/dL)*</i>	166,6 ± 67,7	215,7 ± 124	0,229
<i>Creatinina sérica(mg/dL)*</i>	1,07 ± 0,34	0,81 ± 0,24	0,035
<i>Microalbuminúria (mg/L/24h)*</i>	201,1 ± 265,2	46,51 ± 100,61	0,004
<i>CAT (%)*</i>	12,43 ± 4,9	11,8 ± 5,4	0,593
<i>MDA (uM/L)*</i>	2,78 ± 1,1	3,44 ± 1,26	0,125
<i>PCR (mg/dL)*</i>	3,41 ± 2,6	2,41 ± 2,5	0,256

p <0,05 = diferença significativa após aplicação do teste T independente

*dados de amostra de 62 indivíduos (grupo teste: 10, grupo controle: 52)

Tabela 2. Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos estudados entre os diabéticos tipo 2 com RD e sem RD.

<i>Grupos genotípicos</i>	<i>Com RD</i>	<i>Sem RD</i>	<i>p</i>	<i>OR (IC 95%)</i>
<i>MTHFR (rs1801131)</i>				
<i>AA</i>	68,4% (26)	63,9% (39)		
<i>AC</i>	31,6% (12)	29,5% (18)		
<i>CC</i>	-	6,6% (4)		
<i>AA+AC</i>	100% (38)	93,4% (57)	-	-
<i>AC+CC</i>	31,6% (12)	36,1% (22)	0,670 ^g	0.8 (0.34-1.93)
<i>AA+CC</i>	68,4% (26)	70,5% (43)	0,826 ^h	0.9 (0.37-2.18)
<i>Frequência do alelo C</i>	15,8%	21,3%	0,360	1.4 (0.67-3.06)
<i>MTHFR (rs1801133)</i>				
<i>CC</i>	42,5% (17)	52,2% (36)		
<i>CT</i>	40% (16)	42% (29)		
<i>TT</i>	17,5% (7)	5,8% (4)		
<i>CC+CT</i>	82,5% (33)	94,2% (65)	0,094 ^d	0.3 (0.08-1.06)
<i>CT+TT</i>	57,5% (23)	47,8% (33)	0,434 ^e	1.4 (0.63-3.03)
<i>CC+TT</i>	60% (24)	58% (40)	1,000 ^f	1.8 (0.49-2.40)
<i>Frequência do alelo T</i>	37,5%	26,8%	0,127	0.6 (0.33-1.10)
<i>VDR (rs1544410)</i>				
<i>BB</i>	10% (4)	27,5% (19)		
<i>Bb</i>	50% (20)	43,5% (30)		
<i>bb</i>	40% (16)	29% (20)		
<i>BB+Bb</i>	60% (24)	71% (49)	0,292 ^a	0.6 (0.26-1.38)
<i>Bb+bb</i>	90% (36)	72,4% (50)	0,0496 ^b	3.4 (1.07-10.9)
<i>BB+bb</i>	50% (20)	71% (49)	0,553 ^c	0.8 (0.35-1.68)
<i>Frequência do alelo b</i>	65%	50,7%	0,0478	0.5 (0.31-0.98)

$p < 0,05$ = diferença significativa após aplicação do teste exato de Fisher

^a*bb* como referência, ^b*BB* como referência, ^c*Bb* como referência

^d*TT* como referência, ^e*CC* como referência, ^f*CT* como referência

^g*AA* como referência, ^h*AC* como referência

Tabela 3. Variáveis bioquímicas entre os genótipos do rs1544410 (*BsmI*)

	<i>Com RD (10)</i>			<i>RD + sem RD (62)</i>					
	<i>BB+Bb (6)</i>	<i>bb (4)</i>	<i>p</i>	<i>BB (15)</i>	<i>Bb (27)</i>	<i>bb (20)</i>	<i>BB+Bb (42)</i>	<i>P</i>	
								<i>BB+Bb/bb</i>	<i>BB/bb</i>
<i>HbA1c (%)</i>	7,6 ± 0,84	9,2 ± 2,69	0,762	8,6 ± 1,84	8,15 ± 1,4	8,48 ± 1,7	8,3 ± 1,5	0,704	0,834
<i>Glicemia de jejum (mg/dL)</i>	135,3 ± 34,8	176,5 ± 98,3	0,761	157,46 ± 50,2	161 ± 60,3	164,6 ± 62,4	159,7 ± 56,3	0,764	0,720
<i>Colesterol total (mg/dL)</i>	222,5 ± 68,7	177,25 ± 45	0,352	195,3 ± 30,7	218 ± 53,7	202,7 ± 65,4	209,9 ± 47,7	0,625	0,687
<i>HDL(mg/dL)</i>	43,3 ± 9,3	43,75 ± 7,4	0,914	41,3 ± 9,4	42,6 ± 10,3	43, 5 ± 9,3	42,2 ± 9,8	0,608	0,492
<i>LDL(mg/dL)</i>	146,4 ± 55,3	99,3 ± 45,5	0,196	119,7 ± 29,7	142,3 ± 45,8	121,4 ± 135,5	135,5 ± 42,6	0,277	0,921
<i>Triglicerídeos(mg/dL)</i>	163,6 ± 85,7	171 ± 39,5	0,457	257,6 ± 148,8	186,8 ± 109,6	205,4 ± 95,46	212,1 ± 127,9	0,837	0,215
<i>Creatinina sérica(mg/dL)</i>	1,21 ± 0,37	0,87 ± 0,17	0,139	0,88 ± 0,23	0,87 ± 0,29	0,79 ± 0,27	0,87 ± 0,27	0,294	0,369
<i>Microalbuminúria (mg/L/24h)</i>	220,42 ± 270,9	214,7 ± 338	0,977	32,54 ± 36,2	101,52 ± 199,7	60,57 ± 135,12	76,75 ± 163,6	0,710	0,456
<i>CAT (%)</i>	10,6 ± 1,81	9,7 ± 1,52	0,571	12,42 ± 6,7	11,32 ± 5	10,4 ± 4,08	11,7 ± 5,54	0,637	0,747
<i>MDA (uM/L)</i>	2,83 ± 1	2,7 ± 1,38	0,761	3,61 ± 1,3	3,43 ± 1,31	3,05 ± 1,16	3,5 ± 1,3	0,222	0,207
<i>PCR (mg/dL)</i>	3,71 ± 1,9	2,96 ± 3,75	0,352	1,92 ± 1,14	2,20 ± 1,92	3,43 ± 3,37	2,32 ± 1,8	0,095	0,132

6. DISCUSSÃO

Duração da diabetes é um importante fator de risco para RD (REMA et al., 2005; PARK et al., 2012). A ocorrência é relativamente rara nos 4 primeiros anos após o início da diabetes e tende a aumentar com o passar do tempo e sofrer maior influência do percentual de HbA1C (TAPP et al., 2003). Embora o tempo de duração da DM2 e o mau controle glicêmico evidenciado por alta glicemia e percentual de HbA1C sejam fatores de risco estabelecidos para RD, neste estudo não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, e o resultado pode ser explicado pela média de tempo de diagnóstico próxima de 7 anos para ambos os grupos.

A associação entre albuminúria e RD já descrita na literatura (MANAVIAT et al., 2004; AJOY-MOHAN et al., 2011; KIM et al., 2011; CHEN et al., 2012) foi confirmada neste trabalho ($p=0,004$). Da mesma forma encontramos diferença estatística significativa para a creatinina entre os grupos ($p=0,035$) confirmando a correlação entre as duas complicações ND e RD (HE et al., 2013).

A inflamação está no contexto da patofisiologia da RD e valores aumentados de proteína-C-reativa (PCR) estão relacionados à quadros severos desta complicação (TARR et al., 2013). Provavelmente devido ao pequeno número amostral, não identificamos diferença estatística significativa entre os grupos experimentais embora a média de PCR tenha sido maior no grupo portador de RD (Tabela 3).

A capacidade antioxidante total e a concentração de MDA foram semelhantes entre os grupos com RD e sem RD (Tabela 3).

Estudos apontam uma associação importante entre o genótipo rs1801133/*T* e o desenvolvimento de nefropatia em pacientes diabéticos (ZINTZARAS et al., 2007; CUI et al., 2012) e embora a relação tenha se mostrado controversa, uma metanálise que levou em consideração 10 diferentes estudos de caso controle, mostrou associação do do alelo *T* com nefropatia diabética com significância estatística em ambos os modelos homocigoto e heterocigoto (YANG et al., 2013). O rs1801131 também tem sido relacionado com desenvolvimento de ND ou quadros de macroalbuminúria, seja de forma isolada ou em associação a outros alelos de interesse, incluindo rs1801133 (RAHIMI et al., 2010, JAFARI et al., 2011; EL-BAZ et al., 2012).

Neste estudo os alelos ou genótipos dos polimorfismos rs1801131 e rs1801133 não mostraram estar associados com RD (Tabela 2), no entanto, é necessário levar em consideração que o percentual de homozigotos rs1801133/*TT* no grupo com RD foi o triplo do encontrado no grupo sem RD. Uma metanálise destaca as diferenças de resultados entre estudos asiáticos e europeus no que diz respeito a associação de rs1801133 e RD e ressalta a necessidade de estudos mais rigorosos (ZINTZARAS et al., 2005). Estudos prévios indicam que o rs1801133 está associado ao controle inadequado dos níveis glicêmicos e pode ter também ligação com a progressão da RD em população japonesa (MAEDA et al., 2003; MAEDA et al., 2008) e turquesa (YIGIT et al., 2013), mas a associação não foi confirmada em indivíduos brasileiros de origem europeia (SANTOS et al., 2003).

Baixas concentrações de 25(OH)D estão associadas com um risco maior de T2DM e eventos cardiovasculares e microvasculares no DM2 (FOROUHI et al., 2012; MEZZA et al., 2012; HE et al., 2014; HERRMANN et al., 2014), sugerindo que processos metabólicos afetados por esta vitamina devem estar relacionados a ambas as condições. Polimorfismos no gene *VDR* tem sido estudados como fator de risco de diabetes mas os resultados são controversos e diferentes entre DM1 e DM2. Motohashi et al (2003) encontraram alta frequência do alelo rs1544410*B* em italianos com início agudo de DM1. Em teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) realizado em famílias com DM1 do sul da Índia, foi detectado excesso de transmissão do alelo *b* (MCDERMOTT et al, 1997). Uma recente meta-análise não encontrou evidencia que o alelo *b* modifica o risco de DM2 (LI et al., 2013).

Com relação às complicações crônicas na DM2, há dados indicando que haplótipos específicos do *VDR* (MARTIN et al., 2010) e o polimorfismo rs731236/*T* (*TaqI*) (NOSRATABADI et al., 2010) influenciam no risco de nefropatia diabética. O polimorfismo rs2228570/*f* (*FokI*) modula a relação entre os níveis de 1,25(OH)D e estágios da doença renal crônica (YOKOYAMA et al., 2012). Relação entre o genótipo rs2228570/*ff* foi encontrada em população francesa com RD e com o início da complicação (TAVERNA et al., 2002, 2005).

Neste trabalho nós encontramos uma leve associação entre o alelo *b* do rs1544410 e RD (Tabela 2). Em um estudo de coorte na Itália Central os polimorfismos rs731236 e rs1544410 não apresentaram associação significativa com a presença de complicações no diabetes (CAPOLUONGO et al., 2006) e resultados similares foram obtidos em poloneses com T2DM em relação aos polimorfismos rs2228570, rs7975232,

rs731236 e rs1544410 e RD (CYGANEK et al., 2006). Cabe ressaltar que no estudo Italiano o tempo de diagnóstico dos indivíduos foi de $17.9 \pm 11,4$ e no polonês, variou de forma significativa entre os grupos teste ($14,6 \pm 6,2$) e controle ($9,7 \pm 7,2$).

Quando a análise dos valores de PCR foi realizada estratificada por genótipos de rs1544410 (Tabela 3), uma tendência para valores maiores de PCR em portadores do alelo *b* foi identificada, sem significância estatística. Resultado semelhante foi encontrado em pacientes portadores de câncer com quadro de caquexia nos quais o alelo *b* apareceu associado a níveis elevados de PCR (PUNZI et al., 2012). O nosso resultado sugere que portadores do alelo *b* têm um quadro inflamatório favorecido, o que aumentaria o risco de RD, mas essa relação precisa ser confirmada em maior número de pacientes e ampliando o número de marcadores inflamatórios.

Embora a relação entre microalbuminúria e RD tenha sido confirmada neste trabalho, nós não encontramos diferenças entre os diferentes genótipos de rs1544410 (Tabela 3) diferentemente de Zhang et al (2014) que concluiu que o alelo B está correlacionado com maior albuminúria em população chinesa de etnia Han com DM2 e é provavelmente um fator de risco para o início precoce de nefropatia diabética.

Cabe destacar que critérios de inclusão que restringiram o tempo de diabetes da população pode ter influenciado na identificação de uma associação genética não encontrada em outros estudos. Levando em consideração que o fator tempo afeta de forma extremamente significativa a ocorrência das complicações microvasculares de diabetes, comparar populações com diferenças significantes deste aspecto pode ser prejudicial na análise dos resultados, pois permite que cada vez mais diferentes mecanismos simultâneos estejam presentes. Este é o primeiro estudo a relacionar polimorfismo do VDR com RD em pacientes com DM2 controlando rigorosamente o tempo de diagnóstico da doença numa fase inicial do aparecimento das complicações crônicas. O resultado sugere que o rs1544410 está relacionado ao risco de desenvolvimento de RD em pacientes portadores de diabetes entre 5 e 10 anos. Este dado precisa ser confirmado em amostras maiores.

7. ARTIGO

Submetido à revista: *Journal of Diabetes and its Complications*

Analysis of rs1544410 polymorphism in VDR and Diabetic Retinopathy risk

Rayner Anderson Ferreira do Nascimento^a, Alexandre Sérgio Silva^{b,c}, Isabella Wanderley de Queiroga Evangelista^b, João Modesto Filho^{b,d}, Cecília Neta Alves Pegado Gomes^b, Mayara Karla dos Santos Nunes^e, Darlene Camati Persuhn^f

- a. Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba,
João Pessoa, Brasil. (raynerbiomedicina@gmail.com)
- b. Lauro Wanderley University Hospital, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brasil.
- c. Department of Physical Education, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brasil.
- d. Department of Internal Medicine, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brasil.
- e. Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brasil.
- f. Department of Molecular Biology and Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brasil.
(darlenecp@hotmail.com)

Abstract

Diabetic retinopathy (DR), a chronic complication of diabetes, is a leading cause of blindness in the world. Some genes, such as the vitamin D receptor gene (VDR), have been regarded as good candidates for Type 2 Diabetes Mellitus and microvascular complications. This study was conducted to assess the association between VDR polymorphism (rs1544410) and genetic susceptibility to DR in T2DM patients diagnosed between 5 and 10 years. We collected buccal cells from mouthwash samples from 109 individuals (40 T2DM DR patients and 69 T2DM without DR), and their DNA was isolated. Polymorphisms of the VDR were analyzed by DNA amplification with polymerase chain reaction and endonuclease digestion with BsmI. Albuminuria levels were higher in DR patients than in control T2DM individuals. The frequency of rs1544410 b allele was significantly increased in DR compared to T2DM (65% vs. 50%, respectively) and was associated with increased risk of DR [OR 1.8 (1.02-3.18), $p = 0.047$], in the dominant model Bb/bb x BB [OR 0.3 (0.09-0.93), $p = 0.049$]. A trend of higher CRP levels was identified in the bb genotype. In conclusion, the present study provide evidence for the association of rs1544410 b allele and DR in patients diagnosed between 5 and 10 years.

1. Introduction

The prevalence of diabetes in the global population is 9% representing 382 million cases and Type 2 diabetes mellitus (T2DM) represents at least 90%. Diabetes is placed fourth in the ranking of deaths from NCDs (non-communicable diseases) and is a major public health problem (World Health Organization, 2014).

Diabetic retinopathy (DR) is a microvascular complication of diabetes and is present in more than one third of diabetics aged 20-79 years. The prevalence increases with the duration of diabetes, being rarely found in the first five years, but may be observed in up to 76% of patients after 20 years of the diagnosis of diabetes mellitus (DM) (Yau et al., 2012).

Although the pathogenesis of DR is not known in detail, has been recognized as an inflammatory disease of low grade and which are possibly involved endothelial vascular injury mechanisms (Van Hecke et al., 2005; Ben-Mahmud et al., 2006). Clinical and metabolic factors are associated with the development and progression of DR (He et al., 2013; Kawasaki et al., 2011; Stratton et al., 2001). Studies indicate significant differences in the DR frequency between different ethnic groups (Emanuele et al., 2005) as well as its largest aggregation among non-twins brothers independently of clinical and environmental risk factors provide evidence of the existence of genetic component in susceptibility (Hietala et al., 2008; Rema et al., 2002).

A variety of candidate genes have been investigated for their involvement in the etiology or modulation of DR, including genes encoding proteins involved in oxidative (El-Bab et al., 2013; Hovnik et al., 2009) or proliferative processes (Han et al., 2014), polyol pathway (Abhary et al., 2010) and advanced glycation end products receptors (Yang et al., 2013).

The most active form of vitamin D, 1,25(OH)₂D₃ presents anti-proliferative and anti-oxidant effects which are mediated by binding to the vitamin D receptor (VDR) (Andrukhova et al., 2014; Chen et al., 2014). The VDR belongs to a receptor belonging to a superfamily of transcriptional activators located in the nuclear membrane and expressed in various human tissues (Berger et al., 1988) including ganglion cells, the retinal pigment epithelium and endothelium (Johnson et al., 1995). An association between vitamin D deficiency and the presence of DR has been demonstrated both in T2DM as for DR in different populations (Bajaj et al., 2014; Jee et al., 2014; Kaur et al.,

2011). This fact justifies the analysis of genetic markers in the VDR as possible DR susceptibility markers.

VDR specific haplotype (Martin et al., 2010), and rs731236/T polymorphism (*TaqI*) (Nosratabadi et al., 2010) influence the risk of diabetic nephropathy. The polymorphism rs2228570/f (*FokI*) modulates the relationship between the levels of 1,25OHD and stages of chronic kidney disease (Yokoyama et al., 2012). Relationship between rs2228570/ff genotype was found with the onset of DR in French (Taverna et al. 2002, 2005). The rs1544410 is a substitution adenine/guanine (A>G) located in the 3'UTR region of intron 8 and does not alter the structure and function of the VDR but is strongly related to the syrup poly (A) and potentially affect the stability of mRNA (Vuolo et al., 2012). Prior studies in T2DM with diabetes time exceeding 10 years found no association of this polymorphism with DR (Capoluongo et al., 2006; Cyganek et al., 2006). Given the scarcity of studies involving this polymorphism and DR the objective of this study is to analyze the relationship between the polymorphism rs1544410 and DR in T2DM with diagnostic time between 5 to 10 years and its influence on the systemic inflammatory status, oxidative stress and biochemical parameters using a case-control approach.

2. Materials and methods

2.1. Study design and ethical aspects

This is a sectional study conducted with 109 T2DM patients older than 40 years, treated in Endocrinology and Ophthalmology services of University Hospital of the Federal University of Paraíba in the Northeast of Brazil with documented diabetes between 5 and 10 years of DM2. The study was approved by the Ethics Committee for Human Research of the Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil and the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the institution and the Declaration of Helsinki. All participants provided written informed consent.

Whereas the study intended to show the prevalence of polymorphisms in a diabetic population, a statistical model of sample calculation for epidemiological study that would ensure that the sample size was representative of the population studied was adopted. The sample size calculation took into account the population of João Pessoa, Paraíba State, located in Northeastern of Brazil, estimated at about 783,000 inhabitants, according to the Brazilian Institute of Geography and Estatística 2013, around one

third over the age of 40, which results in 313,200 people over this age. Considering an estimated prevalence of 8% of diabetics, it is expected that the city has something around 25,056 diabetics over the age of 40 years. Assuming a ratio of 20% of diabetics who have retinopathy (10,022 subjects) and confidence level of 95%, with more than 8% error, the sample calculation resulted in 97 individuals.

2.2. Clinical evaluation

The diagnosis of DR was based by fundus examination by ophthalmoscopy after pupil dilation with tropicamide 0.5%. Individuals with T2DM who had any degree of retinopathy were the DR group (n=40; age=56.87 ± 8.95; male=48.78%) while individuals with T2DM but without DR were the T2DM group without DR (n=69; age=58.5 ± 9.12, male=28.57%). In RD group, 29 (72%) patients had non-proliferative form retinopathy (NPDR) while 11 (28%) had proliferative form (RDP). All patients underwent genotypic analysis. Clinical and anthropometric information such as gender, age, duration of T2DM, BMI and blood pressure were obtained at the time of clinical evaluation in Endocrinology. Blood sample for biochemical studies and analysis of parameters related to inflammation and oxidative stress and 24-hour urine for determination of albuminuria were collected from 62 patients. Of these, 10 (8 NPDR + 2 PDR) belonged to the DR group and 52 to those without DR.

2.3. Biochemical measurements

Blood collection was performed by venipuncture to obtain whole blood, serum and plasma after 12 hours fasting. The 24-hour urine for determination of albumin concentration was collected in suitable storage container. HbA1c determinations (immunoturbidimetry), glucose (glucose oxidase), serum creatinine (alkaline picrate), total cholesterol and triglycerides (enzyme-Trinder), HDL (selective ultracentrifugation-detergent), C-reactive protein (CRP) (immunoturbidimetry) and urinary albumin (turbidimetry) were determined using commercial kits in LabMax 240 analyzer (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil). LDL cholesterol concentration was estimated by Friedewald Equation. Microalbuminuria was defined as urinary albumin concentrations > 30 mg/L/24h. To malondialdehyde (MDA), the method based on the reaction of thiobarbituric acid with the decomposition products of hydroperoxides was employed (Ohkawa et al., 1979). The total antioxidant capacity (TAC) of the blood

serum was measured by the reduction of the radical 2,2-diphenyl-1-picryl hidrazila (Brand-Williams et al., 1995).

2.4. Collection and isolation of genomic DNA

Buccal epithelial cells were obtained by mouthwash with 3% sucrose solution and stored in 66% alcohol solution containing 17 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM NaCl and 7 mM EDTA. The extraction procedure was previously described (Aidar and Line, 2007).

2.5. Polymorphism rs1544410 Analysis

The genotypes were determined by PCR-RFLP. The primers used were: 5'CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA3' (sense) 5'AAC CAG CGG GAA GTC AAG GG3' (antisense) (Pani et al., 2000). The amplification occurred as follows: initial denaturation at 94 °C for 5 minutes, 30 cycles of denaturation (1 minute at 94 °C), annealing (1 minute at 58 °C) and extension (3 min at 72 °C) with an extra extension step at the end 10 minutes. The 825 bp amplified product was digested with *BsmI* that recognizes and cleaves the polymorphic allele (b) generating two fragments (650 bp and 175 bp) while the ancestral allele (B) remains at 825 bp. The genotypes were analyzed using 10% polyacrylamide gel electrophoresis and silver nitrate staining procedure.

2.6. Statistical analysis

Quantitative data were expressed as mean and standard deviation, while qualitative data were expressed as absolute numbers or percentages. Comparisons between groups were performed using the independent T test or its corresponding nonparametric Mann-Whitney. The distributions of alleles and genotypes between groups were compared using Fisher's exact test. We adopted a p-value <0.05 as statistically significant. Data were analyzed using Graph Pad 3.0 Instat software (San Diego, CA, USA).

3. Results

Anthropometric, metabolic and epidemiological characteristics of the groups of RD and without RD (controls) are depicted in Table 1. There was no significant difference in anthropometric, epidemiological and metabolic variables except for Microalbuminuria 24 hours ($p=0.004$) and serum creatinine ($p=0.03$) both significantly higher in the DR group. The genotype distribution and allele frequency are identified in Table 2. The rs1544410/b allele [OR 1.8 (1.02-3.18), $p=0.047$] and the dominant model Bb + bb [OR 0.3 (0.09-0.93), $p=0.049$] but not the bb genotype [OR 0.6 (0.26-1.38), $p=0.29$] were associated with increased risk for RD (Table 2). Metabolic parameters were similar between the genotypes of rs1544410 (Table 3), a trend to higher CRP levels in *bb* genotype as compared to those of the genotypes *BB/Bb* was observed ($p=0.09$).

Table 1. Anthropometric characterization, clinical, biochemical and metabolic of the study population

	<i>DR</i>	<i>without DR</i>	<i>p</i>
<i>Sex (M%)</i>	48.78%	28.57%	0.053
<i>Age (years)</i>	56.87 ± 8.95	58.5 ± 9.12	0.365
<i>T2DM duration (years)</i>	7.7 ± 2.22	6.52 ± 2.19	0.062
<i>Hypertension (%)</i>	68.3%	68.6%	0.97
<i>Dyslipidemia (%)</i>	76.92%	62.85%	0.29
<i>BMI (weight/height²)</i>	27.56 ± 4.08	29.02 ± 4.85	0.108
<i>Abdominal circumference (centimeters)</i>	104.75 ± 12.6	101.96 ± 12	0.474
<i>HbA1c (%)*</i>	8.25 ± 1.8	8.34 ± 1.5	0.709
<i>Glucose (mg/dL)*</i>	151.8 ± 65.9	163.8 ± 56.25	0.549
<i>Total cholesterol (mg/dL)*</i>	204.4 ± 62	208.2 ± 52.5	0.839
<i>HDL(mg/dL)*</i>	43.5 ± 8.2	42.5 ± 10	0.758
<i>LDL(mg/dL)*</i>	127,6 ± 54,6	131.5 ± 45.7	0.799
<i>Triglycerides (mg/dL)*</i>	166.6 ± 67.7	215.7 ± 124	0.229
<i>Serum creatinine (mg/dL)*</i>	1.07 ± 0.34	0.81 ± 0.24	0.035
<i>Microalbuminúria (mg/L/24h)*</i>	201.1 ± 265.2	46.51 ± 100.61	0.004
<i>TAC (%)*</i>	12.43 ± 4.9	11.8 ± 5.4	0.593
<i>MDA (uM/L)*</i>	2.78 ± 1.1	3.44 ± 1.26	0.125
<i>CRP (mg/dL)*</i>	3.41 ± 2.6	2.41 ± 2.5	0.256

$p < 0.05$ = significant difference after application of independent T teste (or its corresponding nonparametric Mann-Whitney). * sample data of 62 individuals (RD: 10, without RD: 52)

Table 2. Genotypic and allelic distribution of the polymorphism rs1544410 among type 2 diabetic patients without DR and RD

<i>Genotypes</i>	<i>DR (40)</i>	<i>without DR (69)</i>	<i>p</i>	<i>OR (IC 95%)</i>
<i>BB</i>	10% (4)	27.5% (19)		
<i>Bb</i>	50% (20)	43.5% (30)		
<i>bb</i>	40% (16)	29% (20)		
<i>BB+Bb</i>	60% (24)	71% (49)	0.292 ^a	0.6 (0.26-1.38)
<i>Bb+bb</i>	90% (36)	72.4% (50)	0.0496 ^b	0.3 (0.09-0.93)
<i>BB+bb</i>	50% (20)	71% (49)	0.241 ^c	1.6 (0.75-3.52)
<i>Frequency of allele b</i>	65%	50.7%	0.0478	1.8 (1.02-3.18)

p < 0.05 = statistically significant difference after applying the Fisher's exact test

Table 3. Clinical and biochemical variables between genotypes of rs1544410 (*BsmI*)

	<i>With DR (10)</i>			<i>DR + without DR (62)</i>					
	BB+Bb (6)	bb (4)	<i>p</i>	BB (15)	Bb (27)	bb (20)	BB+Bb (42)	<i>p</i>	
								BBBb/bb	BB/bb
<i>HbA1c (%)</i>	7.6 ± 0.84	9.2 ± 2.69	0.762	8.6 ± 1.84	8.15 ± 1.4	8.48 ± 1.7	8.3 ± 1.5	0.704	0.834
<i>Glucose (mg/dL)*</i>	135.3 ± 34.8	176.5 ± 98.3	0.761	157.46 ± 50.2	161 ± 60.3	164.6 ± 62.4	159.7 ± 56.3	0.764	0.720
<i>Total cholesterol (mg/dL)*</i>	222.5 ± 68.7	177.25 ± 45	0.352	195.3 ± 30.7	218 ± 53.7	202.7 ± 65.4	209.9 ± 47.7	0.625	0.687
<i>HDL(mg/dL)*</i>	43.3 ± 9.3	43.75 ± 7.4	0.914	41.3 ± 9,4	42.6 ± 10.3	43.5 ± 9.3	42.2 ± 9.8	0.608	0.492
<i>LDL(mg/dL)*</i>	146.4 ± 55.3	99.3 ± 45.5	0.196	119.7 ± 29.7	142.3 ± 45.8	121.4 ± 135.5	135.5 ± 42.6	0.277	0.921
<i>Triglycerides (mg/dL)*</i>	163.6 ± 85.7	171 ± 39.5	0.457	257.6 ± 148.8	186.8 ± 109.6	205.4 ± 95.46	212.1 ± 127.9	0.837	0.215
<i>Serum creatinine (mg/dL)*</i>	1.21 ± 0.37	0.87 ± 0.17	0.139	0.88 ± 0.23	0.87 ± 0.29	0.79 ± 0.27	0.87 ± 0.27	0.294	0.369
<i>Microalbuminúria (mg/L/24h)*</i>	220.42 ± 270.9	214.7 ± 338	0.977	32.54 ± 36.2	101.52 ± 199.7	60.57 ± 135.12	76.75 ± 163.6	0.710	0.456
<i>CAT (%)</i>	10.6 ± 1.81	9.7 ± 1.52	0.571	12.42 ± 6.7	11.32 ± 5	10.4 ± 4.08	11.7 ± 5.54	0.637	0.747
<i>MDA (uM/L)</i>	2.83 ± 1	2.7 ± 1.38	0.761	3.61 ± 1.3	3.43 ± 1.31	3.05 ± 1.16	3.5 ± 1.3	0.222	0.207
<i>PCR (mg/dL)</i>	3.71 ± 1.9	2.96 ± 3.75	0.352	1.92 ± 1.14	2.20 ± 1.92	3.43 ± 3.37	2.32 ± 1.8	0.095	0.132

4. Discussion

Low 25(OH)D3 concentrations are associated with an increased risk of macrovascular and microvascular events in T2DM (Forouhi et al., 2012; He et al., 2014; Herrmann et al., 2014; Mezza et al., 2012), suggesting that metabolic processes related to this vitamin should be associated to both conditions.

In this study we found a slight association between rs1544410/b and DR, and a significantly higher presence of the BB genotype in the group without DR, indicating a protective effect of this genotype. In a cohort study in central Italy rs731236 and rs1544410 polymorphisms were not significantly associated with the presence of complications in diabetes (Capoluongo et al., 2006) and similar results were obtained in Polish with T2DM compared to the rs2228570, rs7975232, rs731236 and rs1544410 polymorphisms and DR (Cyganek et al., 2006). This study was conducted in a population with early diabetes while in the Italian study, the duration of diabetes was 17.9 ± 11.4 and in the Polish, this variable was statistically different between test (14.6 ± 6.2) and control (9.7 ± 7.2) groups. This aspect may have influenced the results.

Duration of diabetes is an important risk factor for DR (Rema et al., 2005; Park et al., 2012). The occurrence is relatively rare in the first four years after the onset of diabetes and tends to increase over time and have greater influence of the percentage of HbA1c (Tapp et al., 2003). Although HbA1C is a risk factor established for DR, in this study there were no significant differences between the groups, which may be related to an early diabetes diagnosis. Although the association between albuminuria and DR has been described in the literature and has been confirmed in this study, we did not find differences between the rs1544410 genotypes differently than Zhang et al (2014) which concluded that the B allele is correlated with higher albuminuria in Chinese population Han with T2DM. Ethnic variations have caused controversy also in relations between rs1544410 and the risk of T1DM and T2DM (Motohashi et al., 2003; McDermott et al., 1997; Li et al., 2013) reinforcing the need for studies replicated in different populations.

Inflammation is in the context of the pathophysiology of DR (Tarr et al., 2013) and increased protein C-reactive values (PCR) are related to the severe conditions of this complication (Nowak et al., 2010; Sasongko et al., 2014; Van Hecke et al., 2005) although recent data indicate that the association is related to obesity and not exactly the DR (Fronczyk et al., 2014). In this work, we did not identify statistically significant differences in PCR concentrations, although the average was higher in the DR group. Relevant aspects to be

considered: BMI and waist circumference did not differ between groups and within the DR group, 80% of patients had NPDR. Moreover, a trend towards higher values of CRP in patients with rs1544410/b was identified following an ascending sequence between BB, Bb and bb genotypes. Similar results were found in patients with cancer cachexia in which rs1544410/b was associated with higher CRP levels (Punzi et al., 2012).

A recent in vitro study conducted with human monocytes of T1DM and healthy individuals supplemented with 25(OH)D3 presented an immunomodulatory genotype dependent effect. The rs1544410 bb individuals had lower intermediate cells increases and less inhibition of differentiation of monocytes in response to treatment (Mauf et al., 2015.) The sensitivity to the 25(OH)D3 treatment was according to the following sequence: BB, Bb and bb. Together, these results suggest that carriers of rs1544410/b have a favored inflammation status. The relationship between rs1544410/b in T2DM with inflammation needs to be confirmed in larger numbers of patients and increasing the number of inflammatory markers.

Despite small sample size, the selection based on the duration of diabetes can improve the capacity to compare complicated and non-complicated groups, avoiding biases present in other studies involving genotypes of VDR and T2DM. In addition, it is an epidemiological representative sample of a town in Northeast Brazil.

This is the first study to link polymorphism of the VDR with DR in T2DM patients in the early disease stage. The result suggests that the polymorphism rs1544410 is associated with the risk of developing RD diabetic patients between 5 and 10 years.

References

- Abhary S, Burdon KP, Laurie KJ, Thorpe S, Landers J, Goold L, Lake S, Petrovsky N, Craig JE. Aldose reductase gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility. *Diabetes Care*. 2010; 33(8):1834-6. doi: 10.2337/dc09-1893.
- Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*. 2007; 18(2):148-52.
- Andrukhova O, Slavic S, Zeitz U, Riesen SC, Heppelmann MS, Ambrisko TD, Markovic M, Kuebler WM, Erben RG. Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice. *Mol Endocrinol*. 2014; 28(1):53-64. doi: 10.1210/me.2013-1252.
- Bajaj S, Singh RP, Dwivedi NC, Singh K, Gupta A, Mathur M. Vitamin D levels and microvascular complications in type 2 diabetes. *Indian J Endocrinol Metab*. 2014; 18(4):537-41. doi: 10.4103/2230-8210.137512.
- Ben-Mahmud BM, Chan WH, Abdulahad RM, Datti A, Orlacchio A, Kohner EM, Chibber R. Clinical validation of a link between TNF-alpha and the glycosylation enzyme core 2 GlcNAc-T and the relationship of this link to diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2006; 49(9):2185-91.
- Berger U, Wilson P, McClelland RA, Colston K, Haussler MR, Pike JW, Coombes RC. Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988; 67(3):607-13.
- Brand-Williams B, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*. 1995; 28:25-30.
- Capoluongo E, Pitocco D, Concolino P, Santonocito C, Di Stasio E, d'Onofrio G, Manto A, Giardina B, Ghirlanda G, Ameglio F, Zuppi C. Slight association between type 1 diabetes and "ff" VDR FokI genotype in patients from the Italian Lazio Region. Lack of association with diabetes complications. *Clin Biochem*. 2006; 39(9):888-92.
- Chen J, Wang J, Kim TK, Tieu EW, Tang EK, Lin Z, Kovacic D, Miller DD, Postlethwaite A, Tuckey RC, Slominski AT, Li W. Novel vitamin D analogs as potential therapeutics: metabolism, toxicity profiling, and antiproliferative activity. *Anticancer Res*. 2014; 34(5):2153-63.
- Cyganek K, Mirkiewicz-Sieradzka B, Malecki MT, Wolkow P, Skupien J, Bobrek J, Czogala M, Klupa T, Sieradzki J. Clinical risk factors and the role of VDR gene polymorphisms in diabetic retinopathy in Polish type 2 diabetes patients. *Acta Diabetol*. 2006; 43(4):114-9.
- El-Bab MF, Zaki NS, Mojaddidi MA, Al-Barry M, El-Beshbishy HA. Diabetic retinopathy is associated with oxidative stress and mitigation of gene expression of antioxidant enzymes. *Int J Gen Med*. 2013; 6:799-806. doi: 10.2147/IJGM.S40665.

Emanuele N, Sacks J, Klein R, Reda D, Anderson R, Duckworth W, Abaira C, et al. Ethnicity, race, and baseline retinopathy correlates in the veterans affairs diabetes trial. *Diabetes Care*. 2005; 28(8):1954-8.

Forouhi NG, Ye Z, Rickard AP, Khaw KT, Luben R, Langenberg C, Wareham NJ: Circulating 25-hydroxyvitamin D concentration and the risk of type 2 diabetes: results from the European Prospective Investigation into Cancer (EPIC)-Norfolk cohort and updated meta-analysis of prospective studies. *Diabetologia* 2012; 55:2173–2182.

Fronczyk A, Molęda P, Safranow K, Piechota W, Majkowska L. Increased concentration of c-reactive protein in obese patients with type 2 diabetes is associated with obesity and presence of diabetes but not with macrovascular and microvascular complications or glycemic control. *Inflammation*. 2014; 37(2):349-357. doi:10.1007/s10753-013-9746-4.

Han L, Zhang L, Xing W, Zhuo R, Lin X, Hao Y, Wu Q, Zhao J. The associations between VEGF gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis of 11 case-control studies. *J Diabetes Res*. 2014; 805801. doi: 10.1155/2014/805801.

He F, Xia X, Wu XF, Yu XQ, Huang FX. Diabetic retinopathy in predicting diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes and renal disease: a meta-analysis. *Diabetologia*. 2013; 56(3):457-66. doi: 10.1007/s00125-012-2796-6.

He R, Shen J, Liu F, Zeng H, Li L, Yu H, Lu H, Lu F, Wu Q, Jia W. Vitamin D deficiency increases the risk of retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2014; 31(12):1657-64. doi: 10.1111/dme.12581.

Herrmann M, Sullivan DR, Veillard A, McCorquodale T, Straub IR, Scott R, Laakso M, Topliss D, Jenkins AJ, Blankenberg S, Burton A, Keech AC; for the FIELD study investigators. Serum 25-Hydroxy Vitamin D: A Predictor of Macrovascular and Microvascular Complications in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2014 [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25524951.

Hietala K1, Forsblom C, Summanen P, Groop PH. Heritability of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2008; 57(8):2176-80. doi: 10.2337/db07-1495

Hovnik T, Dolžan V, Bratina NU, Podkrajšek KT, Battelino T. Genetic Polymorphisms in Genes Encoding Antioxidant Enzymes Are Associated With Diabetic Retinopathy in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. Dec 2009; 32(12): 2258–2262. doi: 10.2337/dc09-0852.

Jee D, Han Kd, Kim EC. Inverse association between high blood 25-hydroxyvitamin D levels and diabetic retinopathy in a representative Korean population. *PLoS One*. 2014; 9(12):e115199. doi: 10.1371/journal.pone.0115199.

Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Campbell RJ, Kumar R. Immuno-localization of the calcitriol receptor, calbindin-D28k and the plasma membrane calcium pump in the human eye. *Curr Eye Res*. 1995; 14(2):101-8.

Kawasaki R, Tanaka S, Tanaka S, Yamamoto T, Sone H, Ohashi Y, Akanuma Y, Yamada N, Yamashita H, et al. Incidence and progression of diabetic retinopathy in Japanese adults with

type 2 diabetes: 8 year follow-up study of the Japan Diabetes Complications Study (JDCCS). *Diabetologia*. 2011; 54(9):2288-94. doi: 10.1007/s00125-011-2199-0.

Kaur H, Donaghue KC, Chan AK, Benitez-Aguirre P, Hing S, Lloyd M, Cusumano J, Pryke A, Craig ME. Vitamin D deficiency is associated with retinopathy in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2011; 34(6):1400-2. doi: 10.2337/dc11-0103.

Li L, Wu B, Liu JY, Yang LB. Vitamin D receptor gene polymorphisms and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Arch Med Res*. 2013; 44(3):235-41.

Martin RJ, McKnight AJ, Patterson CC, Sadlier DM, Maxwell AP; Warren 3/UK GoKinD Study Group. A rare haplotype of the vitamin D receptor gene is protective against diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25(2):497-503. doi: 10.1093/ndt/gfp515.

Mauf S, Penna-Martinez M, Jentzsch T, Ackermann H, Henrich D, Radeke HH, Brück P, Badenhoop K, Ramos-Lopez E. Immunomodulatory effects of 25-hydroxyvitamin D3 on monocytic cell differentiation and influence of vitamin D3 polymorphisms in type 1 diabetes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2014; 147:17–23. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.11.001.

McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, Aganna E, Curtis D, Boucher BJ, Snehalatha C, Hitman GA. Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia*. 1997; 40(8):971-5.

Mezza T, Muscogiuri G, Sorice GP, Prioletta A, Salomone E, Pontecorvi A, Giaccari A. Vitamin D deficiency: a new risk factor for type 2 diabetes? *Ann Nutr Metab*. 2012; 61(4):337-48. doi: 10.1159/000342771.

Motohashi Y, Yamada S, Yanagawa T, Maruyama T, Suzuki R, Niino M, Fukazawa T, Kasuga A, Hirose H, Matsubara K, Shimada A, Saruta T. Vitamin D receptor gene polymorphism affects onset pattern of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(7):3137-40.

Nosratabadi R, Arababadi MK, Salehabad VA, Shamsizadeh A, Mahmoodi M, Sayadi AR, Kennedy D. Polymorphisms within exon 9 but not intron 8 of the vitamin D receptor are associated with the nephropathic complication of type-2 diabetes. *Int J Immunogenet*. 2010; 37(6):493-7. doi: 10.1111/j.1744-313X.2010.00953.x.

Nowak M, Wielkoszyński T, Marek B, Kos-Kudła B, Swietochowska E, Siemińska L, Karpe J, Kajdaniuk D, Głogowska-Szeląg J, Nowak K. Antioxidant potential, paraoxonase 1, ceruloplasmin activity and C-reactive protein concentration in diabetic retinopathy. *Clin Exp Med*. 2010 Sep;10(3):185-92. doi: 10.1007/s10238-009-0084-7.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; 95(2):351-8.

Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH, Badenhoop K. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes*. 2000; 49(3):504-7.

Park CY, Park SE, Bae JC, Kim WJ, Park SW, Ha MM, Song SJ. Prevalence of and risk factors for diabetic retinopathy in Koreans with type II diabetes: baseline characteristics of Seoul Metropolitan City-Diabetes Prevention Program (SMC-DPP) participants. *Br J Ophthalmol*. 2012; 96:151–155

Punzi T, Fabris A, Morucci G, Biagioni P, Gulisano M, Ruggiero M, Pacini S. C-reactive protein levels and vitamin d receptor polymorphisms as markers in predicting cachectic syndrome in cancer patients. *Mol Diagn Ther*. 2012; 16(2):115-24.

Rema M, Premkumar S, Anitha B, et al. Prevalence of diabetic retinopathy in urban India: the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES) eye study, I. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:2328–33.

Rema M, Saravanan G, Deepa R, Mohan V. Familial clustering of diabetic retinopathy in South Indian Type 2 diabetic patients. *Diabet Med*. 2002; 19(11):910-6.

Sasongko MB, Wong TY, Jenkins AJ, Nguyen TT, Shaw JE, Wang JJ. Circulating markers of inflammation and endothelial function, and their relationship to diabetic retinopathy. *Diabet Med*. 2014; [Epub ahead of print]. doi: 10.1111/dme.12640.

Stratton IM, Kohner EM, Aldington SJ, Turner RC, Holman RR, Manley SE, Matthews DR. UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia*. 2001; 44(2):156-63.

Tapp RJ, Shaw JE, Harper CA, de Courten MP, Balkau B, McCarty DJ, Taylor HR, Welborn TA, Zimmet PZ; AusDiab Study Group. The prevalence of and factors associated with diabetic retinopathy in the Australian population. *Diabetes Care*. 2003; 26(6):1731-7.

Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN Ophthalmol*. 2013: 343560.

Taverna MJ, Selam JL, Slama G. Association between a protein polymorphism in the start codon of the vitamin D receptor gene and severe diabetic retinopathy in C-peptide-negative type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(8):4803-8.

Taverna MJ, Sola A, Guyot-Argenton C, Pacher N, Bruzzo F, Slama G, Reach G, Selam JL. Taq I polymorphism of the vitamin D receptor and risk of severe diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2002; 45(3):436-42.

Van Hecke MV, Dekker JM, Nijpels G, Moll AC, Heine RJ, Bouter LM, Polak BC, Stehouwer CD. Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the Hoorn Study. *Diabetologia*. 2005; 48:1300-1306.

Vuolo L, Di Somma C, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012; 3:58. doi: 10.3389/fendo.2012.00058.

World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva: World Health Organization, 2014. Available:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf. Accessed 22 January 2014.

Yang L, Wu Q, Li Y, Fan X, Hao Y, Sun H, Cui Y, Han L. Association of the receptor for advanced glycation end products gene polymorphisms and circulating RAGE levels with diabetic retinopathy in the Chinese population. *J Diabetes Res.* 2013; 264579. doi: 10.1155/2013/264579.

Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global Prevalence and Major Risk Factors of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care.* 2012; 35(3): 556–564. doi: 10.2337/dc11-1909.

Yokoyama K, Nakashima A, Urashima M, Suga H, Mimura T, Kimura Y, Kanazawa Y, Yokota T, Sakamoto M, Ishizawa S, Nishimura R, Kurata H, Tanno Y, Tojo K, Kageyama S, Ohkido I, Utsunomiya K, Hosoya T. Interactions between serum vitamin D levels and vitamin D receptor gene FokI polymorphisms for renal function in patients with type 2 diabetes. *PLoS One.* 2012; 7(12):e51171. doi: 10.1371/journal.pone.0051171.

8. CONCLUSÕES

- Os grupos RD e sem RD apresentaram parâmetros bioquímicos (HbA1c, glicemia, colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos), inflamatório (PCR) e do estresse oxidativo (CAT e MDA) sem diferenças significantes, com exceção de concentração de albumina na urina e creatinina sérica que foram maiores no grupo RD;
- A frequência do alelo rs1544410/b foi significativamente maior no grupo com RD; sugerindo seu envolvimento no risco de desenvolvimento da complicação, enquanto que a frequência do genótipo BB (rs1544410) foi maior no grupo sem RD, indicando um efeito protetor;
- Os parâmetros bioquímicos e do estresse oxidativo não foram afetados pelos genótipos rs1544410 na população estudada, no entanto, observou-se uma tendência para valores maiores de PCR em indivíduos bb, sugerindo um perfil inflamatório mais acentuado neste genótipo;
- Não foram detectadas diferenças significantes entre a distribuição de genótipos e frequência alélica de rs1801133 e rs1801131; embora o alelo rs1801133/T tenha sido mais frequente no grupo RD.

8.1. Considerações finais

Estudos mais robustos são necessários para confirmar as seguintes hipóteses levantadas por este trabalho:

- A relação entre rs1544410 e RD; tanto em RDNP quanto RDP; sendo para isso necessário aumentar o número amostral de ambas as categorias e analisá-las separadamente;
- O caráter pró-inflamatório do alelo rs1544410/b em ambos os modelos; RDNP e RDP;
- A relação entre o genótipo rs1801133 e o risco de RD.

REFERÊNCIAS

ABDELTIF, E; BENRAHMA, H; CHAROUTE, H; BARAKAT, H; KANDIL, M; ROUBA, H. Vitamin D receptor gene polymorphisms and vitamin D status and susceptibility to type 2 diabetes mellitus in Moroccan patients. **Int. Journal of Sci. and Res. Publi.** v. 4, n. 8, p. 1-8, 2014.

ABHARY, S; BURDON, K. P; LAURIE, K. J; THORPE, S; LANDERS, J; GOOLD, L; LAKE, S; PETROVSKY, N; CRAIG, J. E. Aldose reductase gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility. **Diabetes Care.** v. 33, n. 8, p. 1834-6, 2010.

AIDAR, M; LINE, S. R. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. **Braz. Dent. J.** v. 18, n. 2, p. 148-52, 2007.

AJOY MOHAN VK, NITHYANANDAM S, IDICULLA J (2011) Microalbuminuria and low hemoglobin as risk factors for the occurrence and increasing severity of diabetic retinopathy. **Indian J. Ophthalmol.** v. 59, n. 3, p. 207–210, mai-jun. 2011.

ALBU, J. B; LU, J; MOORADIAN, A. D; KRONE, R. J; NESTO, R. W; PORTER, M. H; RANA, J. S; ROGERS, W. J; SOBEL, B. E; GOTTLIEB, S. H. Relationships of obesity and fat distribution with atherothrombotic risk factors: baseline results from the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation 2 Diabetes (BARI 2D) trial. **Obesity.** v. 18, n.5. p. 1046-1054, mai. 2010.

AL-DAGHRI, N. M; AL-ATTAS, O. S; ALKHARFY, K. M; KHAN, N; MOHAMMED, A. K; VINODSON, B; ANSARI, M. G. A; ALENAD, A; ALOKAIL, M. S. Association of VDR gene variants with factors related to the metabolic syndrome, type 2 diabetes and vitamin D deficiency. **Gene,** v. 542, p. 129-133, 2014a.

AL-DAGHRI, N. M; GUERINI, F. R; AL-ATTAS, O. S; ALOKAIL, M. S; ALKHARFY, K. M; DRAZ, H. M; M; AGLIARDI, C; COSTA, A. S; SAULLE, I; MOHAMMED, A. K; BIASIN, M; CLERICI, M. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity and inflammatory activity. **PLOS ONE,** v. 9, n. 7, [arquivo eletrônico, ID: e102141], 2014b.

ALVARSSON, A; SANDGREN, B; WENDEL, C; ALVARSSON, M; BRISMAR, K. A retrospective analysis of amputation rates in diabetic patients: can lower extremity amputations be further prevented? **Cardiovasc. Diabetol.** v. 11, [arquivo eletrônico, ID: 18], mar. 2012

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes. standards of medical care in diabetes 2015. **Diabetes Care,** v. 38, suplemento 1, Jan. 2015.

ANDRADE, F. C. D; GUEVARA, P. E; LEBRÃO, M. L; DUARTE, Y. A. O. Correlates of the incidence of disability and mortality among older adult Brazilians with and without diabetes mellitus and stroke. **BMC Public Health.** v. 12, [arquivo eletrônico, ID 361], 2012.

ARAI, H; MIYAMOTO, K; TAKETANI, Y; YAMAMOTO, H; IEMORI, Y; MORITA, K; TONAI, T; NISHISHO, T; MORI, S; TAKEDA, E. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. **J. Bone Miner. Res.** v. 12, p. 915–921, 1997.

ASHCROFT, F. M; RORSMAN, P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. **Cell.** v. 148, n. 6, p. 1160-71, 2012.

AYDEMIR, O; TURKCUOGLU, P; GULER, M; CELIKER, U; USTUNDAG, B; YILMAZ, T; METIN, K. Plasma and vitreous homocysteine concentrations in patients with proliferative diabetic retinopathy. **The J. Retin. Vit. Diseases**, v. 28, n. 5, p. 741-743, 2005.

BAINES, M.; KREDAN, M. B.; USHER, J.; DAVISON, A.; HIGGINS, G.; TAYLOR, W.; WEST, C.; FRASER, W. D.; RANGANATH, L. R. The association of homocysteine and its determinants: MTHFR genotype, folate, vitamin B12 and vitamin B6 with bone mineral density in postmenopausal British women. **Bone**, v. 40, n. 3, p. 730-736, mar. 2007.

BAKER, A. R; McDONNELL, D. P; HUGHES, M; CRISP, T. M; MANGELSDORF, D. J; HAUSSLER, M. R; PIKE, J. W; SHINE, J; O'MALLEY, B. W. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v. 85: 3294-3298, 1988.

BANERJEE, C; MOON, Y. P; PAIK, M. C; RUNDEK, T; MCLAUGHLIN, C. M; VIEIRA, J. R; SACCO, R. L; ELKIND, M. S. V. Duration of diabetes and risk of ischemic stroke: the northern manhattan study. **Stroke**. v. 43, n. 5, p. 1212–1217, mai. 2012.

BARBIERI L, VERDOIA M, SCHAFFER A, NICCOLI G, PERRONE-FILARDI P, BELLOMO G, MARINO P, SURYAPRANATA H, LUCA GD. Elevated homocysteine and the risk of contrast-induced nephropathy: a cohort study. **Angiology**. [em impressão], mai. 2014.

BARNETT, P. A; GONZÁLEZ, R.G; J, CHYLACK JR; CHENG, H. M. The effect of oxidation on sorbitol pathway kinetics. **Diabetes**, v. 35, 1986.

BELTRAMO, E; PORTA, M. Pericyte loss in diabetic retinopathy: mechanisms and consequences. **Curr Med Chem**. v. 20, n. 26, p. 3218-25, 2013.

BID, H. K; KONWAR, R; AGGARWAL, C. G; GAUTAM, S; SAXENA, M; NAYAK, V. L; BANERJEE, M; Vitamin D receptor (*FokI*, *BsmI* and *TaqI*) gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus: a North Indian study. **Indian Journal of Medical Sciences**, v. 63, p. 187-194, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde. Relatório de situação: Paraíba. 5 ed. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2011. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema_nacional_vigilancia_saude_pb_5ed.pdf>. Acesso em: 28 Jan 2015.

BRAZIONIS, L; ROWLEY, K; ITSIOPOULOS, C; HARPER, C. A; O'DEA, K. Homocysteine and diabetic retinopathy, **Diabetes Care**, v. 31, n. 1, p. 50-56, jan. 2008.

CAPOLUONGO, E; PITOCOCO, D; CONCOLINO, P; SANTONOCITO, C; DI STASIO, E; D'ONOFRIO, G; MANTO, A; GIARDINA, B; GHIRLANDA, G; AMEGLIO, F; ZUPPI, C. Slight association between type 1 diabetes and "ff" VDR FokI genotype in patients from the Italian Lazio Region. Lack of association with diabetes complications. **Clin Biochem.** v. 39, n. 9, p. 888-92, 2006.

CASTRO, R; RIVERA, I; RAVASCO, P; CAMILO, M; JAKOBS, C; BLOM, B; ALMEIDA, I. T. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→T and 1298A→C mutations are associated with DNA hypomethylation. **J. Med. Genet.** v. 41, n. 6, p. 454–458, jun. 2004.

CHAMNAN, P; SIMMONS, R. K; SHARP, S. J; GRIFFIN, S. J; WAREHAM, N. J. Cardiovascular risk assessment scores for people with diabetes: a systematic review. **Diabetologia**, v. 52, p. 2001–2014, 2009.

CHATURVEDI, N; STEVENS, L; FULLER, J. H. Which features of smoking determine mortality risk in former cigarette smokers with diabetes? The World Health Organization Multinational Study Group. **Diabetes Care.** v. 20, n. 8, p. 1266-1272, ago. 1997.

CHEN, Y. H; CHEN, H. S; TARNG, D. C. More impact of microalbuminuria on retinopathy than moderately reduced GFR among type 2 diabetic patients. **Diabetes Care.** v. 35, n. 4, p. 803–808, abr. 2012.

CHENG, Z; XIAOFENG YANG, X; WANG, H. Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction, **Current Hypertens. Rev.** v. 5, n. 2, p.158–165, mai. 2009.

CHEUNG, A. K; FUNG, M. K; LO, A. C; LAM, T. T; SO, K. F; CHUNG, S. S; CHUNG, S. K. Aldose reductase deficiency prevents diabetes-induced blood-retinal barrier breakdown, apoptosis, and glial reactivation in the retina of db/db mice. **Diabetes.** v. 54, n. 11, p. 3119-25, nov. 2005.

CHILELLI, N. C; BURLINA, S; LAPOLLA, A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a “glycooxidation-centric” point of view. **Nut. Metab. Cardiovasc. Diseases.** v. 20, p. 1-7, 2013.

CLARKE, M; DODSON, P. M. PKC inhibition and diabetic microvascular complications. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 21, n. 4, p. 573-86, 2007.

CRIDER, K. S; YANG, T. P; BERRY, R. J; BAILEY, L. B. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role, **Advances in Nutr.** v. 3, n. 1, p. 21-38, jan. 2012.

CUI, W. P.; DU, B.; JIA, Y.; ZHOU, W. H.; LIU, S. M.; CUI, Y. C.; MA, F. Z.; LUO, P.; MIAO, L. N. Is C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for diabetic nephropathy or diabetes mellitus in a Chinese population? **Arch. Med. Res. Cidade do México**, v. 43, n. 1, p. 42-50, 2012.

CURTIS, T. M; GARDINER, T. A; STITT, A. W. Microvascular lesions of diabetic retinopathy: clues towards understanding pathogenesis? **Eye**, London, v. 23, n. 7, p. 1496-508, jul. 2009.

CYGANEK, K; MIRKIEWICZ-SIERADZKA, B; MALECKI, M. T; WOLKOW, P; SKUPIEN, J; BOBREK, J; CZOGALA, M; KLUPA, T; SIERADZKI, J. Clinical risk factors and the role of VDR gene polymorphisms in diabetic retinopathy in Polish type 2 diabetes patients. **Acta Diabetol.** v. 43, p. 114-119, 2006.

ECHOUFFO-TCHEUGUI, J. B, KENGNE, A. P. On the importance of global cardiovascular risk assessment in people with type 2 diabetes. **Prim. Care Diabetes.** v. 7, n. 2, p. 95-102, jul. 2013.

EL-ASRAR, A. M. B. Evolving Strategies in the Management of Diabetic Retinopathy. **Middle East Afr. J. Ophthalmol.** v. 20, n. 4, p. 273–282, out-dez. 2013.

EL-BAB MF, ZAKI NS, MOJADDIDI MA, AL-BARRY M, EL-BESHBISHY HA. Diabetic retinopathy is associated with oxidative stress and mitigation of gene expression of antioxidant enzymes. **Int. J. Gen. Med.** v. 6, p. 799-806, 2013.

ELOUALID, A; ABIDI, O; CHARIF, M; EL HOUATE, B; BENRAHMA, H; LOUANJLI, N. et al. Association of the MTHFR A1298C Variant with Unexplained Severe Male Infertility. **PLoS ONE.** v. 7, n. 3, [arquivo eletrônico, ID: e341111], 2012.

EMANUELE, N; SACKS J, KLEIN R, REDA D, ANDERSON R, DUCKWORTH W, ABRAIRA C, et al. Ethnicity, race, and baseline retinopathy correlates in the veterans affairs diabetes trial. **Diabetes Care.** v. 28, n. 8, p. 1954-8, 2005.

ERRERA FI, SILVA ME, YEH E, MARANDUBA CM, FOLCO B, TAKAHASHI W, PEREIRA AC, KRIEGER JE, PASSOS-BUENO MR. Effect of polymorphisms of the MTHFR and APOE genes on susceptibility to diabetes and severity of diabetic retinopathy in Brazilian patients. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 39, n. 7, p. 883-8, jul. 2006.

FALLETI, E; BITETTO, D; FABRIS, C; CUSSIGH, A; FONTANINI, E; FORNASIERE, FUMOLO, E. E; BIGNULIN, S; CMET, S; MINISINI, R; PIRISI, M; TONIUTTO, P. Vitamin D receptor gene polymorphisms and hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. **World. J. Gastroenterology.** v. 16, n. 24, p. 3016–3024. jun. 2010.

FATEMI, O; YURIDITSKY, E; TSIOUFIS, C; TSACHRIS, D; MORGAN, T; BASILE, J; BIGGER, T; CUSHMAN, W; GOFF, D; SOLIMAN, E. Z, THOMAS, A, PAPADEMETRIOU, V. Impact of intensive glycemic control on the incidence of atrial fibrillation and associated cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (from the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study). **American J. Cardiol.** v. 114, n. 8, p. 1217-22, out. 2014.

FRIEDMAN, G; GOLDSCHMIDT, N; FRIEDLANDER, Y; BEN-YEHUDA, A; SELHUB, J; BABAIEY, S; MENDEL, M; KIDRON, M; BAR-ON, H. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. **The Journal of Nutr.** v. 129, n. 9, p. 1656-1661, set.1999.

FROSST, P; BLOM, H. J; MILOS, R; GOYETTTE, P; SHEPPARD, C. A; MATTHEWS, R. G; BOERS, G. J. H; DEN HEIJER, M; KLUIJTMANS, L. A. J; VAN DEN HEUVEL, L. P;

ROZEN, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genet.** v. 10, p. 111-113, 1995.

FU, Z; GILBERT, E. R; LIU, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. **Curr Diabetes Rev.** v. 9, n. 1, p. 25–53, jan 2013.

FUHRMAN, B. J; FREEDMAN, D. M;BHATTI, P;DOODY, M. M;FU, Y;CHANG, S;LINET, M. S; SIGURDSON, A. J. Sunlight, polymorphisms of vitamin D-related genes and risk of breast cancer. **Anticancer Res.** v. 33, n. 2, p. 543-551, 2013.

GERALDES, P; KING, G. L. Activation of protein kinase C isoforms & its impact on diabetic complications. **Circulation Research.** v. 106, n. 8, p. 1319–1331, abr. 2010.

GERSTEIN, H. C; MILLER, M. E; BYINGTON, R. P; GOFF, D. C; BIGGER J. T; BUSE, J. B; CUSHMAN, W. C; GENUTH, S. ISMAIL-BEIGI, F; GRIMM, R. H; PROBSTFIELD, J. L; SIMONS-MORTON, D. G; FRIEDEWALD, W. T; et al. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. **N. Engl. J. Med.** v. 358, n. 24, p. 2545-59, jun. 2008.

GINSBERG, H. N; ELAM, M. B; LOVATO, L. C; CROUSE, J. R; LEITER, L. A; LINZ, P; FRIEDEWALD, W. T; BUSE, J. B; GERSTEIN, H. C; PROBSTFIELD, J; et al. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.** v. 362, p. 1563-1574, 2010.

GROSS, C; ECCLESHALL, TR; MALLOY, P. J; VILLA, M. L; MARCUS, R; FELDMAN, D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. **J. Bone Miner. Res.**, v. 11, p. 1850-1855, 1996.

GUO SW, MAGNUSON VL, SCHILLER JJ, WANG XJ, WU Y. Metaanalysis of vitamin D receptor polymorphisms and type 1 diabetes: a HuGE review of genetic association studies. **Am J. Epidemiology**, v. 164, p. 711-724, 2006.

HAFFNER, S. M; LEHTO, S; RÖNNEMAA, T; PYÖRÄLÄ, K; LAAKSO M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. **N. Engl. J. Med.** v. 339, p. 229-234, 1998.

HAN L, ZHANG L, XING W, ZHUO R, LIN X, HAO Y, WU Q, ZHAO J. The associations between VEGF gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis of 11 case-control studies. **J. Diabetes Res.** [arquivo eletrônico, ID: 2014:805801], 2014.

HAN Y, PAN Y, DU Y, TONG N, WANG M, ZHANG Z, WAN L, WANG L. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and nonsyndromic orofacial clefts susceptibility in a southern Chinese population. **DNA Cell Biol.** v. 30, n. 12, p. 1063-8, 2011.

HANSON, N. Q; ARAS, O; YANG, F; TSAI, M. Y. C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. **Clin. Chem.** v. 47, n. 4, p. 661-6, abr. 2001.

HATA, J; ARIMA, H; ROTHWELL, P. M; WOODWARD, M; ZOUNGAS, S; ANDERSON, C; PATEL, A; NEAL, B; GLASZIOU, P; HAMET, P. et al. Effects of visit-to-visit variability in systolic blood pressure on macrovascular and microvascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus: the ADVANCE trial. **Circulation**. v. 128, n. 12, p. 1325-1334, set. 2013.

HE, F; XIA, X; WU, X. F; YU, X. Q; HUANG, F. X. Diabetic retinopathy in predicting diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes and renal disease: a meta-analysis. **Diabetologia**. v. 56, n. 3, p. 457-66, mar. 2013.

HEIJER, M. D.; LEWINGTON, S.; CLARKE, R. Homocysteine, MTHFR and risk of venousthrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. **J. Thromb. Haemostasis**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 415-422, fev. 2005.

HIETALA, K; FORSBLOM, C; SUMMANEN, P; GROOP, P. H. Heritability of proliferative diabetic retinopathy. **Diabetes**. v. 57, n. 8, p. 2176-80, 2008.

HOFMANN, M. A; KOHL B, ZUMBACH MS, BORCEA V, BIERHAUS A, HENKELS M, AMIRAL J, SCHMIDT AM, FIEHN W, ZIEGLER R, WAHL P, NAWROTH PP. Hyperhomocyst(e)inemia and endothelial dysfunction in IDDM. **Diabetes Care**. v. 21, n. 5, p. 841-8, mai. 1998.

HOLMAN, R. R; SOURIJ, H; CALIFF, R. M. Cardiovascular outcome trials of glucose-lowering strategies in type 2 diabetes--Authors' reply. **Lancet**. v. 384, n. 9948, p. 1097-8, set. 2014.

HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: ameta-analysis of the randomized trials. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 82, n. 4, p. 806-812, 2005.

HOMOCYSTEINE STUDIES COLLABORATION. Homocysteine and risk os ischemic heart disease and stroke a meta-analysis, **J. Am. Med. Association**, v. 288, n. 16, p. 2015-2022, out. 2002.

HOSSEIN-NEZHAD, A; ESHAGHI, S. M; MAGHBOOLI, Z; MIRZAEI, K; SHIRZAD,M;BRYON CURLETTO, B; CHEN, T. C. The Role of Vitamin D Deficiency and Vitamin D Receptor Genotypes on the Degree of Collateralization in Patients with Suspected Coronary Artery Disease. **Bio. Med. Res. International**, [arquivo eletrônico, ID: 304250], 2014.

HOVNIK, T; DOLŽAN, V; BRATINA, N. U; PODKRAJŠEK, K. T; BATTELINO, T. Genetic Polymorphisms in Genes Encoding Antioxidant Enzymes Are Associated With Diabetic Retinopathy in Type 1 Diabetes. **Diabetes Care**. v. 32, n. 12, p. 2258-2262, dez. 2009.

HSU, Y. C; LEE, P. H; LEI, C. C; HO, C; SHIH, Y. H; LIN, C. L. Nitric oxide donors rescue diabetic nephropathy through oxidative-stress-and nitrosative-stress-mediated Wnt signaling pathways. **J. Diabetes Investig.** v. 6, n. 1, p. 24-34, jan. 2015.

HU, F. B. Globalization of diabetes. **Diabetes Care**, v, 34, n. 6, p. 1249-1257, jun. 2011.

INGLES, S. A; HAILE, R. W; HENDERSON, B. E; KOLONE, L. N; NAKAICHI, G; SHI, C. Y; YU, M. C; ROSS, R. K; COETZEE, G. A. Strength of linkage disequilibrium between two vitamin D receptor markers in five ethnic groups: implications for association studies. **Cancer Epidem. Biomarkers Prev.** v. 6, n. 2, p. 93-8, 1997.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes Atlas 6th, 2014.** What is diabetes? Disponível em: < http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf>. Acesso em: 07 dez. 2014.

JACKSON, C. A; JONES, N. R; WALKER, J. J; FISCHBACHER, C. M; COLHOUN, H. M; LEESE, G. P; LINDSAY, R. S; MCKNIGHT, J. A; MORRIS, A. D; PETRIE, J. R; SATTAR, N; WILD, S. H. Area-based socioeconomic status, type 2 diabetes and cardiovascular mortality in Scotland. **Diabetologia.** v. 55, n. 11, p. 2938-45, nov. 2012.

JIANBO, L; YUCHE, C; MING, S; JINGRONG, T.; QING, D.; YU, Z.; JIAWEI, C.; HONGXING, W. Association of homocysteine with peripheral neuropathy in Chinese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Res. Clinical Practice,** Limerick, v. 93, n. 1, p. 38-42, jul. 2011.

JONES, G; PROSSER, D. E; KAUFMANN, M. Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. **J. Lipid Research,** v. 55, n.1, p. 13–31, 2014.

KAISER, N; SASSON, S; FEENER, E. P; BOUKOBZA-VARDI, N; HIGASHI, S; MOLLER, D. E; DAVIDHEISER, S; PRZYBYLSKI, R. J; KING, G. L. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. **Diabetes,** New York, v. 42, n. 1, p. 80-89, jan. 1993.

KALETA, B; BOGACZEWICZ,J; ROBAK, E;SYSA-JWDRZEJOWSKA, A;WRZOSEK, M;SZUBIERAJSKA, W;MRÓZ, P; AUKASZKIEWICZ, J; WOFNIACKA, A. Vitamin D receptor gene *BsmI* polymorphism in polish patients with systemic lupus erythematosus, **ISRN Endocrinol.** v. 2013, [arquivo eletrônico, ID: 427818], jun. 2013.

KANG, S. S; WONG, P. W; BOCK, H. G; HORWITZ, A; GRIX, A. Intermediate hyperhomocysteinemia resulting from compound heterozygosity of methylenetetrahydrofolate reductase mutations. **Am. J. Hum. Genet.** v. 48, n. 3, p. 546-51, mar. 1991.

KAWASAKI, R; TANAKA, S; TANAKA, S; YAMAMOTO, T; SONE, H; OHASHI, Y; AKANUMA, Y; YAMADA, N; YAMASHITA, H. et al. Incidence and progression of diabetic retinopathy in Japanese adults with type 2 diabetes: 8 year follow-up study of the Japan Diabetes Complications Study (JDCS). **Diabetologia.** v. 54, n. 9, p. 2288-94, set. 2011.

KAYADIBI, H; SERTOGLU, E; UYANIK, M. Plasma total homocysteine levels in diabetic retinopathy. **Biomed Res Int.** ID: 758634, ago. 2014.

KIM, J; KWON, H; PARK, Y; LEE, J; KIM, M; YOON, K; LEE, W. C; CHA, B; SON, H. Prevalence and Associated Factors of Diabetic Retinopathy in Rural Korea: The Chungju Metabolic Disease Cohort Study. **J. Korean Med. Sci.** v. 26, n. 8, p. 1068-1073, ago. 2011.

KLEIN C. H; BLOCH, K. V. Estudos Seccionais. In: *Epidemiologia*, 2^oed. **Atheneu**, Porto Alegre, 2009, p. 193.

KLEIN, R; KLEIN, B. E; MOSS, S. E; CRUICKSHANKS, K. J. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. **Ophthalmology**. v. 105, n. 10, p. 1801-15, out. 1998.

KLEIN, R; KNUDTSON, M. D; LEE, K. E; GANGNON, R; KLEIN, B. E; The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy: XXII the twenty-five-year progression of retinopathy in persons with type 1 diabetes. **Ophthalmology**. v. 115, p. 1859-68, 2008.

KOLLURU, G. K; BIR, S. C; KEVIL, C. G. Endothelial Dysfunction and Diabetes: Effects on Angiogenesis, Vascular Remodeling, and Wound Healing. **Inter. J. Vascular Medicine**, [arquivo eletrônico, ID: 918267], 2012.

KONIG. M; LAMOS, E. M; STEIN, S. A; DAVIS, S. N. An insight into the recent diabetes trials: what is the best approach to prevent macrovascular and microvascular complications? **Curr. Diabetes Rev.** v. 9, n. 5, p. 371-81, 2013.

KRISHNAN, A. V; FELDMAN, D. Activation of protein kinase- C inhibits vitamin D receptor gene expression. **Mol. Endocrinol**, v. 5, p. 605–612, 1991b.

KRISHNAN, A. V; FELDMAN, D. Cyclic adenosine 39.59-monophosphate upregulates 1,25-dihydroxyvitamin D receptor gene expression and enhances hormone action. **Mol Endocrinol**, v. 6, p. 198–206, 1991a.

LI, C; LIU, Z; WANG, L; GERSHENWALD, J. E; LEE, J. E; PRIETO, V. G; DUVIC, M; GRIMM, E. A; WEI, Q. Haplotype and genotypes of the VDR gene and cutaneous melanoma risk in non-hispanic whites in texas: a case-control study. **Int. J. Cancer**, v. 122, n. 9, p. 2077-2084, mai. 2008.

LI, X; LIAO, Q; ZHANG, S; CHEN, M. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms with the susceptibility of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL) in Chinese population. **Euro. J. Med. Research**, v. 19, n. 1, p. 5, 2014.

LITWAK, L; GOH, S; HUSSEIN, Z; MALEK, R; PRUSTY, V; KHAMSEH, M. E. Prevalence of diabetes complications in people with type 2 diabetes mellitus and its association with baseline characteristics in the multinational A1chieve study. **Diabetol. Metab. Syndr.** v. 5, n. 1, p. 57, 2013.

LIU, C. C; HO, W. Y; LEU, K. L; TSAI, H. M; YANG, T. H. Effects of S-adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage and cell cytotoxicity in murine hepatic and microglia cell lines. **J. Biochem. Mol. Toxicol.** v. 23, n. 5, p. 349-56, set. 2009.

LOOKER, H. C; NYANGOMA, S. O; CROMIE, D; OLSON, J. A; LEESE, G. A; BLACK M, et al. Diabetic retinopathy at diagnosis of type 2 diabetes in Scotland. **Diabetologia**. v. 55, n. 9, p. 2335-2342, set. 2012.

LORENZI, M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. **Exper. Diabetes Research**, [arquivo eletrônico, ID: 61038], 2007.

LUO, X; YANG, M; WU, F. et al. Vitamin D receptor gene *BsmI* polymorphism B allele, but not BB genotype, is associated with systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population. **Lupus**, v. 21, p. 53-9, 2012.

LYONS, T. J; BASU, A. Biomarkers in diabetes: hemoglobin A1c, vascular and tissue markers. **Transl. Res.** v. 159, n. 4, p. 303-12, abr. 2012.

MA, Y; LI, L; GENG, X. B; HONG, Y; SHANG, X. M; TAN, Z; SONG, Y. X; ZHAO, G. Y; ZHAO, B. Q; TIAN, M. R. Correlation between hyperhomocysteinemia and outcomes of patients with acute myocardial infarction. **Am. J. Ther.** [em impressão] 2014.

MAEDA, M.; YAMAMOTO, I.; FUKUDA, M.; MOTOMURA, T.; NISHIDA, M.; NONEN, S.; FUJIO, Y.; KASAYAMA, S.; AZUMA, J. MTHFR gene polymorphism is susceptible to diabetic retinopathy but not to diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. **J. Diab. Complications**, New York, v. 22, n. 2, p. 119-25, mar-abr. 2008.

MAEDA, M; YAMAMOTO, I; FUKUDA, M; NISHIDA, M; FUJITSU, J; NONEN, S; IGARASHI, T; MOTOMURA, T; INABA, M; FUJIO, Y; AZUMA, J. MTHFR gene polymorphism as a risk factor for diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients without serum creatinine elevation. **Diabetes Care**, v. 26, p. 547-548, 2003a.

MAEDA, M.; YAMAMOTO, I.; FUKUDA, M.; NISHIDA, M.; FUJITSU, J.; NONEN, S.; IGARASHI, T.; MOTOMURA, T.; INABA, M.; FUJIO, Y.; AZUMA, J. Diabetic Retinopathy Possibly Results From Poor Blood Sugar Control Associated With MTHFR Gene Polymorphism in Type 2 Diabetic Patients. **Diabetes Care**, New York, v. 26, n. 6, p. 1948, jun. 2003b.

MALAGUARNERA, G; GAGLIANO, C; GIORDANO, M; SALOMONE, S; VACANTE, M; BUCOLO, C; CARACI, F; REIBALDI, M; DRAGO, F; AVITABILE, T; MOTTA, M. Homocysteine serum levels in diabetic patients with non proliferative, proliferative and without retinopathy. **Biomed. Res. Int.** [arquivo eletrônico, ID: 191497], abr. 2014.

MANAVIAT, M. R; AFKHAMI, M; SHOJA, M. R. Retinopathy and microalbuminuria in type II diabetic patients. **BMC Ophthalmol.** v. 4, p. 9, jul. 2014.

MARON, B. A; LOSCALZO, J. The treatment of hyperhomocysteinemia. **Annu. Rev. Med.** v. 60, p. 39-54. 2009.

MATHEUS, A. S. M; TANNUS, L. R. M; COBAS, R. A; PALMA, C. C. S; NEGRATO, C. A; GOMES, M. B. Impact of Diabetes on Cardiovascular Disease: An Update. **Int. J. Hypertens.** 2013:653789, 2013.

MIYAMOTO, K; KESTERSON, R. A; YAMAMOTO, H; TAKETANI, Y; NISHIWAKI, E; TATSUMI, S; INOUE, Y; MORITA, K; TAKEDA, E; PIKE, J. W. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. **Mol. Endocrinol.** v. 11, p. 1165-1179, 1997.

MOCHARLA, H; BUTCH, A. W; PAPPAS, A. A; FLICK, J. T; WEINSTEIN, R. S; TOGNI, P; JILKA, R. L; ROBERSON, P. K; PARFITT, A. M; MANOLAGAS, S. C. Quantification of Vitamin D Receptor mRNA by Competitive Polymerase Chain Reaction in PBMC: Lack of Correspondence with Common Allelic Variants. **J. Bone Min. Research**, v. 12, n. 5, p. 726-733, 1997.

MONTICIELO, O. A; BRENOL, J. C; CHIES, J. A; LONGO, M. G; RUCATTI, G. G; SCALCO, R; XAVIER, R. M. The role of BsmI and FokI vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 21, n.1, p. 43-52, 2012.

MORRISON, N. A; YEOMAN, R; KELLY, P. J; EISMAN, J. A. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: Vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. **Proc. National. Acad. Sci.** v. 89, p. 6665-6669, 1992.

MOSTOWSKA, A; LIANERI, M; WUDARSKI, M; OLESIŃSKA, M; JAGODZIŃSKI, P. P. Vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI and TaqI polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus. **Mol. Biol. Rep.** v. 40, n. 2, p. 803-10, fev. 2013.

NAGELE, P; MEISSNER, K; FRANCIS, A; FÖDINGER, M; SACCONI, N. L. Genetic and environmental determinants of plasma total homocysteine levels: impact of population-wide folate fortification. **Pharm. Gen.**, v. 21, n. 7, p. 426-31, jul. 2011.

NATHAN, D. N; ZINMAN, B; CLEARY, P. A; BACKLUND, J. C; GENUTH, S; MILLER, R; ORCHARD, T. J. et al. Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration. **Arch. Intern. Med.** v. 169, n. 14, p. 1307-1316, jul. 2009.

NEUGEBAUER, S; BABA, T; KUROKAWA, K; WATANABE, T. Defective homocysteine metabolism as a risk factor for diabetic retinopathy. **Lancet**, v. 349, p. 473-474, 1997.

NILSSON, P. M; CEDERHOLM J; ZETHELIUS, B. R; ELIASSON, B. R; EEG-OLOFSSON, K; GUDBJ RNSDOTTIR S. Trends in blood pressure control in patients with type 2 diabetes: data from the Swedish National Diabetes Register (NDR). **Blood Press.** v. 20, n. 6, p. 348-54, 2011.

NIU, W; QI, Y. An updated meta-analysis of methylenetetrahydrofolate reductase gene 677C/T polymorphism with diabetic nephropathy and diabetic retinopathy. **Diabetes Res. Clin. Pract.** v. 95, p. 110-8, 2012.

OH, J. L; BARRETT-CONNOR, E. Association Between Vitamin D Receptor Polymorphism and Type 2 Diabetes or Metabolic Syndrome in Community-Dwelling Older Adults: The Rancho Bernardo Study. **Metabolism**, v. 51, n. 3, p. 356-359, 2002.

OLA, M. S; NAWAZ, M. I; KHAN, H. A; ALHOMIDA, A. S. Neurodegeneration and neuroprotection in diabetic retinopathy. **Int. J. Mol. Sci.** v. 14, n. 2, p. 2559-2572. jan. 2013.

OTT, C; JACOBS, K; HAUCKE, E; NAVARRETE SANTOS A; GRUNE, T; SIMM, A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biol.** v. 2, p. 411-29, jan. 2014.

OZAKI, Y; NOMURA, S; NAGAHAMA, M; YOSHIMURA, C; KAGAWA, H; FUKUHARA, S. Vitamin-D receptor genotype and renal disorder in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. **Nephron**. v. 85, n. 1, p. 86-91, 2000.

PACINI, S; PUNZI, T; GULISANO, M; et al. Vitamin D receptor alleles and C-reactive protein in hemodialysis patients. **Ital. J. Anat. Embryol**. v. 113, n. 1, p.55-62, 2008.

PIRIE, A; VAN HEYNINGEN, R; The effect of diabetes on the content of sorbitol, glucose, fructose and inositol in the human lens. **Exp. Eye Res**. v. 3, p. 124-131, 1964.

POLJSAK, B; MILISAV, I. The neglected significance of "antioxidative stress". **Oxid. Med. Cell. Longev**. [arquivo eletrônico, ID: 480895], 2012.

PUNZI T, FABRIS A, MORUCCI G, BIAGIONI P, GULISANO M, RUGGIERO M, PACINI S. C-reactive protein levels and vitamin d receptor polymorphisms as markers in predicting cachectic syndrome in cancer patients. **Mol. Diagn. Ther**. v. 16, n. 2, p. 115-24, 2012.

RAHAL, A; KUMAR, A; SINGH, V; YADAV, B; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S; DHAMA, K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **Bio. Med. Research International**, [arquivo eletrônico, ID: 761264], 2014.

RAIMONDI S, JOHANSSON H, MAISONNEUVE P, GANDINI S. Review and meta-analysis on vitamin D receptor polymorphisms and cancer risk. **Carcinogenesis** 30: 1170–1180, 2009.

RAINS, J. L; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling and diabetes. **Free Radical Biol. & Med**. v. 50, n. 5, p. 567–575, 2011.

RASK-MADSEN, C; KING, G. L. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. **Cell Metab**. v. 17, n. 1, p. 20-33, jan. 2013.

REDDY, M. A; ZHANG, E; NATARAJAN, R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. **Diabetologia**. v. 58, n. 3, p. 443-55, 2015.

RICHARD, E; DESVIAT, L. R; UGARTE, M; PÉREZ, B. Oxidative stress and apoptosis in homocystinuria patients with genetic remethylation defects. **J. Cell Biochem**. v. 114, n. 1, p. 183-91, jan. 2013.

ROZYCKA, A., JAGODZINSKI, P. P., KOZUBSKI, W., LIANERI, M., DORSZEWSKA, J. Homocysteine level and mechanisms of injury in Parkinson's disease as related to MTHFR, MTR, and MTHFD1 genes polymorphisms and L-dopa treatment. **Current Genomics**, v. 14, n. 8, p. 534–542, 2013.

SAKULPIPATSIN, W; VERASERTNIYOM, O; NANTIRUJ, K; TOTEMCHOKCHYAKARN, K; LERTSRISATIT, P; JANWITYANUJIT, S. Vitamin D receptor gene *BsmI* polymorphisms in Thai patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res. Ther**. v. 8, n. 2, p. R48, 2006.

SALINERO-FORT, M. A; ANDRÉS-REBOLLO, F; BURGOS-LUNAR, C; ARRIETA-BLANCO, F. J; GÓMEZ-CAMPELO, P. Four-Year Incidence of Diabetic Retinopathy in a

Spanish Cohort: The MADIABETES Study. **PLoS One**. v. 8, n. 10, [arquivo eletrônico, ID: e76417], 2013.

SANTOS, K. G; TSCHIEDEL, B; SCHNEIDER, J, SOUTO, K; ROISENBERG, I. Diabetic retinopathy in Euro-Brazilian type 2 diabetic patients: relationship with polymorphisms in the aldose reductase, the plasminogen activator inhibitor-1 and the methylenetetrahydrofolate reductase genes. **Diabetes Res. Clin. Pract.** v. 61, p. 133-136, 2003.

SCHAFFER, S. W; JONG, C. J; MOZAFFARI, M. Role of oxidative stress in diabetes-mediated vascular dysfunction: unifying hypothesis of diabetes revisited. **Vascul. Pharmacol.** v. 57, n. 5-6, p. 139-49. nov-dez. 2012.

SCHALINSKE, K. L; SMAZAL, A. L. Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker. **Advances in Nutr.** v. 3, n. 6, p. 755-62, nov. 2012.

SETTIN A, EL-BAZ R, ISMAEEL A, TOLBA W, ALLAH WA. Association of ACE and MTHFR genetic polymorphisms with type 2 diabetes mellitus: Susceptibility and complications. **J. Renin. Angiot. Aldosterone Syst.** [em impressão], 2014.

SIMÓ, R; HERNÁNDEZ, C. Prevention and treatment of diabetic retinopathy: evidence from large, randomized trials. The emerging role of fenofibrate. **Rev. Recent. Clin. Trials.** v. 7, n. 1, p. 71-80, fev. 2012.

SINGH, V. P; BALI, A; SINGH, N; JAGGI, A. S. Advanced glycation end products and diabetic complications. **Korean J. Physiol. Pharmacol.** v. 18, n. 1, p. 1-14, fev. 2014.

SKOVSO, S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. **J. Diabetes Investig.** v. 5, n. 4, p. 349–358, jul. 2014.

SLUIK, D; BUIJSSE, B; MUCKELBAUER, R; KAAKS, R; TEUCHER, B; JOHNSEN, N. F; TJØNNELAND, A; OVERVAD, K; OSTERGAARD, J. N; AMIANO, P. et al. Physical activity and mortality in individuals with diabetes mellitus: a prospective study and meta-analysis. **Arch. Intern. Med.** v. 172, n. 17, p. 1285-1295, set. 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2013-2014.** Prevenções primária e secundária da doença macrovascular no paciente com diabetes. AC Farmacêutica, 2014. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/images/pdf/diretrizes-sbd.pdf>>. Acesso em: 07 dez. 2014.

SONG, Y; COOK, N. R; ALBERT, C. M; VAN DENBURGH, M; MANSON, J. E. Effect of homocysteine-lowering treatment with folic Acid and B vitamins on risk of type 2 diabetes in women: a randomized, controlled trial. **Diabetes.** v. 58, n. 8, p. 1921-8, ago. 2009.

STAMLER, J. S; OSBORNE, J. A; JARAKI, O; RABBANI, L. E; MULLINS, M; SINGEL, D; LOSCALZO, J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. **J. Clin. Invest.** v. 91, n. 1, p. 308-18, jan. 1993.

STANGER, O; WEGER, M; RENNER, W; KONETSCHNY, R. Vascular dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia. Implications for atherothrombotic disease. **Clin. Chem. Lab. Med.**

v. 39, n. 8, p. 725-33, ago. 2001.

STARKEBAUM, G; HARLAN J. M. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. **J. Clin. Invest.** v. 77, n. 4, p. 1370-6, abr. 1986.

STRATTON, M. I; ADLER, A. I; NEIL, H. A. W; MATTHEWS, D. R; MANLEY, C. A. C; HADDEN, D; TURNER, R. C; HOLMAN, R. R. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. **BMJ**, London, v. 321, p. 405-412, ago. 2000.

SZWERGOLD, B. S; KAPPLER, F; BROWN, T. R; Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats. **Science**, v. 247, n. 4941, p. 451-454, 1990.

TABIT, C. E; CHUNG, W. B.; HAMBURG, N. M; VITA, J. A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. **Reviews Endo. Metab. Disorders**, v. 11, n. 1, p. 61-74, 2010.

TANG, J; KERN, T. S. Inflammation in diabetic retinopathy. **Prog. Retin. Eye Res.** v. 30, n. 5, p. 343-58, set. 2011.

TARR, J. M; KAUL, K; CHOPRA, M; KOHNER, E. M; CHIBBER, R. Pathophysiology of diabetic retinopathy. **ISRN Ophthalmol.** [arquivo eletrônico, ID: 343560], 2013.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.** Massachusetts, v. 329, n. 14, p. 977-986, set. 1993.

UITTERLINDEN, A. G; FANG, Y; VAN MEURS, J. B; POLS, H. A; VAN LEEUWEN, J. P. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene**, v. 338, p. 143-56, 2004.

UITTERLINDEN, A. G; POLS, H.A; BURGER, H; HUANG, Q; VAN DAELE, P. L; VAN DUIJN, C. M; HOFMAN, A; BIRKENHAGER, J. C; VAN LEEUWEN, J. P. A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density. **J. Bone Miner.Res.** v. 11, p. 1241-1248, 1996.

UKINC, K; ERSOZ, H. O; KARAHAN, C; EREM, C; EMINAGAOGLU, S; HACIHASANOGLU, A. B; YILMAZ, M; KOCAK, M. et. al. Methyltetrahydrofolate reductase C677T gene mutation and hyperhomocysteinemia as a novel risk factor for diabetic nephropathy. **Endocrine**. v. 36, n. 2, p. 255-61, 2009.

UKPDS GROUP. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet**, v. 352, p. 837-53, 1998.

VAN DER PUT, N. M; GABREELS, F; STEVENS, E. M; SMEITINK, J. A; TRIJBELS, F. J; ESKES, K; VAN DEN HEUVEL, L. P; BLOM, H. J. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? **Am. J. Hum. Genet.** v. 62, n. 5, p. 1044-1051, mai. 1998.

VERBEEK, W; GOMBART, A. F; SHIOHARA, M; CAMPBELL, M; KOEFFLER, H. P. Vitamin D receptor: no evidence for allele-specific mRNA stability in cells which are heterozygous for the *Taq I* restriction enzyme polymorphism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 238, n. 1, p. 77-80, set. 1997.

VINCENT, A. M; CALLAGHAN, B. C; SMITH, A. L; FELDMAN, E. L. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. **Nat. Rev. Neurol.** v. 7, n. 10, p. 573-83, set. 2011.

WAGNER, C. L., TAYLOR, S. N., & HOLLIS, B. W. Does Vitamin D Make the World Go “Round”? **Breastfeeding Medicine**, v. 3, n. 4, p. 239-250, 2008.

WALD, D. S; MALCOLM, L; MORRIS, J. K. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis, **BMJ**, v. 325:1202, nov. 2002.

WANG, G; ZHANG, Q; XU, N; XU, K; WANG, J; HE, W; YANG, T. Associations between two polymorphisms (*FokI* and *BsmI*) of vitamin d receptor gene and type 1 diabetes mellitus in asian population: a meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, [arquivo eletrônico, ID: e89325], 2014.

WANG, H; FAN, D; HONG, T. Is the C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase gene or plasma homocysteine a risk factor for diabetic peripheral neuropathy in Chinese individuals? **Neural Regeneration Research**, v. 7, n. 30, p. 2384–2391, 2012.

WEISBERG, I. S; JACQUES, P. F; SELHUB, J; BOSTOM, A. G; CHEN, Z; CURTIS ELLISON, R; ECKFELDT, J. H; ROZEN, R. The 1298A>C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. **Atherosclerosis**. v. 156, n. 2, p. 409-15, jun. 2001.

WHITFIELD, G. K; REMUS, L. S; JURUTKA, P. W; ZITZER, H; OZA, A. K; DANG, H. T; HAUSSLER, C. A; GALLIGAN, M. A; THATCHER, M. L; ENCINAS DOMINGUEZ, C; HAUSSLER, M. R. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptorgene. **Mol Cell Endocrinol**, v. 177, n. 1, p. 145–159, 2001.

WILKINSON, C. P; FERRIS, F. L; KLEIN, R. E; LEE, P. P; AGARDH, C. D; DAVIS, M; DILLS, D; KAMPIK, A; PARARAJASEGARAM, R; VERDAGUER, J. T. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. **Ophthalmology**. v. 110, n. 9, p. 1677-82, 2013.

WIROSTKO, B; WONG, T. Y; SIMÓ, R. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. **Progress in Retinal and Eye Research**. v. 27, n. 6, p. 608–621, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva: World Health Organization, 2014. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf. Acesso em: 20 Jan 2015.

XU, J; XU, J. L; WANG, Y. X; YOU, Q. S; JONAS, J. B; WEI, W. B. Ten-Year Cumulative Incidence of Diabetic Retinopathy. The Beijing Eye Study 2001/2011. **PLoS One**. v. 9, n. 10,

[arquivo eletrônico, ID: e111320], 2014.

YANG L, WU Q, LI Y, FAN X, HAO Y, SUN H, CUI Y, HAN L. Association of the receptor for advanced glycation end products gene polymorphisms and circulating RAGE levels with diabetic retinopathy in the Chinese population. **J Diabetes Res.** 2013: 264579, 2013.

YANG, S; ZHANG, J; FENG, C; HUANG, G. MTHFR 677T variant contributes to diabetic nephropathy risk in Caucasian individuals with type 2 diabetes: a meta-analysis. **Metabolism.** v. 62, n. 4, p. 586-94, abr. 2013.

YIGIT, S; KARAKUS, N; INANIR, A. Association of MTHFR gene C677T mutation with diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy. **Molecular Vision,** v. 19, p. 1626-1630, 2013.

YOSHIOKA, K; YOSHIDA, T, TANAKURA, Y, KOGURE, A, UMEKAWA, T; TODA, H, YOSHIKAWA, T. No association between the MTHFR gene polymorphism and diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients without overt nephropathy. **Diabetes Care,** v. 26, p. 1947-1948, 2003.

YOUNG, B. A; LIN, E; KORFF, M. V; SIMON, G; CIECHANOWSKI, P; LUDMAN, E. J; EVERSON-STEWART, S; KINDER, L; OLIVER, M; BOYKO, E. J; KATON, W. J. Diabetes complications severity index and risk of mortality, hospitalization, and healthcare utilization. **Am. J. Manag. Care.** v. 14, n. 1, p. 15-23, jan 2008.

ZHANG J, LI W, LIU J, WU W, OUYANG H; et al. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and type 1 diabetes mellitus risk: An update by meta-analysis. **Molecular and Cellular Endocrinology,** v. 355, p. 135–142, 2012.

ZINTZARAS, E.; UHLIG, K.; KOUKOULIS, G. N.; PAPATHANASIOU, A. A.; STEFANIDIS, I. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism as a risk factor for diabetic nephropathy: a meta-analysis. **Journal of Human Genetics,** London, v. 52, n.11, p. 881-90, set. 2007.

ZORENA, K; RACZYŃSKA, D; RACZYŃSKA, K. Biomarkers in diabetic retinopathy and the therapeutic implications. **Mediators Inflamm.** [arquivo eletrônico, ID: 193604], nov. 2013.

ANEXO A

PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA (CEP-HULW 796.459/2014)

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
LAURO WANDERLEY/UFPB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise dos diabéticos usuários do SUS atendidos em serviço de referência de João Pessoa

Pesquisador: Darlene Camali Persuhn

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 4

CAAE: 20108513.2.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA DO ESTADO DA PARAIBA - FAPES

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 796.459

Data da Relatoria: 26/08/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa com a população diabética usuária do Sistema Único de Saúde - SUS. Serão incluídos na amostra pacientes diabéticos com tempo de diagnóstico entre 5 a 10 anos atendidos nos ambulatórios de Endocrinologia, Oftalmologia/CEROF e Nefrologia dos

Centros de Referência Hospital Universitário Lauro Wanderley, além do CAISI e CAIS de Jaguaribe.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a população diabética usuária do SUS atendida no município de João Pessoa em serviço de referência quanto aos indicadores clínicos, laboratoriais, sócio-demográficos, educacionais e genéticos relacionados às complicações crônicas visando identificar pontos de acerto e de fragilidade da atenção básica e proposição de estratégias de prevenção.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Existem alguns riscos em potencial que os participantes podem sofrer principalmente em relação à coletas sanguíneas, mas que serão tomados todos os cuidados para minimizá-los seguindo os preceitos da biossegurança.

Endereço: HULW-4º andar - Campus I - UFPB
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-900
 UF: PB Município: JOAO PESSOA
 Telefone: (83)3218-7302 Fax: (83)3218-7522 E-mail: cephube@hotmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
LAURO WANDERLEY/UFPB



Continuação do Parecer: 796.459

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa experimental descritiva a ser desenvolvida como Trabalho de Conclusão de Curso e Dissertação de Mestrado. Pesquisadores: Darlene Camati Persuhn e Rayner Anderson Ferreira do Nascimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados.

Recomendações:

O(s) pesquisador(es) responsável fica(m), desde já, notificado(s) da obrigatoriedade de ao término da pesquisa enviar (online) ao CEP/Plataforma Brasil o relatório final da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou Inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo de pesquisa APROVADO pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/HULW), em reunião ordinária realizada em 26/08/2014.

Informamos que qualquer alteração no projeto, dificuldades, assim como os eventos adversos deverão ser comunicados a este Comitê de Ética em Pesquisa através do Pesquisador responsável uma vez que, após aprovação da pesquisa o CEP-HULW toma-se corresponsável pela mesma nos seus aspectos éticos.

O CEP/HULW parabeniza o(s) pesquisador(es).

Endereço: HULW-4º andar - Campus I - UFPB
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-900
 UF: PB Município: JOAO PESSOA
 Telefone: (83)3216-7302 Fax: (83)3216-7522 E-mail: cephulw@hotmail.com

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Vocês estão convidados a participar de uma pesquisa que recebe o título: **Análise dos diabéticos usuários do SUS atendidos em serviço de referência de João Pessoa** que visa avaliar alguns fatores genéticos, que são aqueles que herdamos dos nossos pais, possivelmente envolvidos com complicações do diabetes. Caso a relação se confirme, novas estratégias de diagnóstico antecipado das lesões e até de prevenção poderão ser consideradas.

Para participar do estudo será necessário responder algumas questões sobre o que você sente e seus eventuais problemas de saúde, informações que você tem a respeito de diabetes e as atividades físicas que realiza. Esta entrevista demorará entre 10 e 15 minutos. Você irá também realizar uma coleta de sangue. Será utilizada uma seringa descartável e agulha para coletar uma quantidade de sangue que equivale a duas colheres de sopa. Este procedimento pode causar um desconforto local e formação de hematomas que desaparecem em poucos dias.

Trata-se de um procedimento rotineiro nos postos de coleta dos laboratórios de análises clínicas. Uma amostra de sangue será encaminhada para um laboratório localizado na UFPB onde serão realizadas análises relacionadas à possibilidade de complicações no diabetes: hemoglobina glicosilada, creatinina. A hemoglobina glicosilada é uma proteína que circula no sangue e a sua medida indica o quanto ela reagiu com glicose, permitindo estimar a quantidade de glicose média no sangue num período de 2 a 3 meses. A creatinina é um composto que é produzido nos músculos e seu aumento no sangue pode indicar comprometimento renal, já que sua eliminação acontece através deste órgão. Realizará também exame nos olhos por médico oftalmologista. Outra amostra de sangue será utilizada para avaliar a capacidade antioxidante do metabolismo normal, denominados radicais livres, que podem ser responsáveis por complicações no diabetes.

Para se submeter ao exame de DNA você deverá permitir a coleta de células da mucosa da boca através de bochecho com uma solução contendo sacarose, que não deverá ser engolida. Esta solução deverá permanecer na boca por 1 minuto e depois depositada em recipiente próprio. O referido procedimento é indolor. Esta coleta tem por objetivo extrair DNA, que consiste de uma parte das células onde está armazenado o material genético dos seres vivos. Nela está o código que determina as características de um indivíduo. Após realizada a coleta de células, os pesquisadores irão isolar o DNA das amostras, e farão análises numa região do material genético relacionada ao metabolismo do ácido fólico, uma importante vitamina que o organismo precisa para estar saudável. Além disso serão analisadas regiões que permitirão avaliar a capacidade antioxidante do seu metabolismo através da genética.

Toda a coleta de dados acontecerá preservando a sua identidade. Todos os documentos relacionados a esta pesquisa serão consultados exclusivamente pelos pesquisadores, não sendo permitido o acesso a nenhuma outra pessoa ou entidade. O material genético será mantido no Departamento de Biologia Molecular, sob guarda da coordenadora desta pesquisa, podendo futuramente ser utilizado em outros projetos de pesquisa relacionados a diabetes. Serão utilizados exclusivamente para fins científicos.

Os resultados obtidos nesta pesquisa serão exclusivamente utilizados para fins científicos, e quando divulgados não citarão em nenhum momento o seu nome.

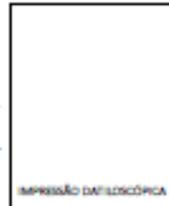
Participando ou não desta pesquisa, o tratamento ou acompanhamento no Serviço não será afetado. A opção de participar fica a seu critério, e mesmo assinando esse termo, pode retirar o consentimento a qualquer momento, bastando para isso contatar a pesquisadora principal sem a necessidade de oferecer qualquer explicação.

Caso deseje participar, poderá optar em ter ou não acesso aos resultados do exame genético. Em caso afirmativo, a pesquisadora agendará um momento oportuno após a finalização da coleta de dados para realizar a devolutiva. O benefício gerado por essa pesquisa está na geração de informações sobre os fatores de risco que levam a ocorrência de complicações microvasculares na população diabética de João Pessoa. Estas informações poderão resultar no aprimoramento das ações de prevenção e acolhimento desempenhadas pelo Sistema Único de Saúde – SUS.

Este documento visa cumprir todas as recomendações da resolução 466/12 que regulamenta a realização de pesquisas em seres humanos no Brasil.

NOME: _____

NASC. ___/___/___ ASSINATURA: _____



Caso tenha dúvidas a respeito do projeto ou seu andamento, favor contatar a pesquisadora responsável, ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley (CEP/HULW – 4º andar – Fone: (83) 3216-7964).

Email: comiteoetico@hulw.ufpb.br

Pesquisadora responsável: Darlene Camati Persuhn

Departamento de Biologia Molecular – UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

darlene.cp@hotmail.com

Pesquisador participante: Rayner Anderson Ferreira do Nascimento

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular – UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

raynerbiomedicina@gmail.com - Fone: (83) 9652-0429

Assinatura Pesquisadora responsável

Assinatura do Pesquisador responsável pela coleta de dados